



Evolution intraspécifique du génome et modes de reproduction générateurs de diversité génétique chez *Agaricus bisporus*

Banafsheh Jalalzadeh Moghaddam Shahri

► To cite this version:

Banafsheh Jalalzadeh Moghaddam Shahri. Evolution intraspécifique du génome et modes de reproduction générateurs de diversité génétique chez *Agaricus bisporus*. Biologie végétale. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0420 . tel-01250743

HAL Id: tel-01250743

<https://theses.hal.science/tel-01250743>

Submitted on 5 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE VÉGÉTALE

Par Banafskeh JALALZADEH MOGHADDAM SHAHRI

**Evolution intraspécifique du génome et modes de reproduction
générateurs de diversité génétique chez *Agaricus bisporus***

Sous la direction de: M. Gérard BARROSO

Soutenue le 12/12/2014

Membres du jury :

Mme Fabienne Malagnac, Professeure, Université Paris Sud	Rapporteur
Mme Anne-Marie Farnet Da Sylva, MCU, Université Aix-Marseille	Rapporteur
Mr Thiery Noel, Professeur, Université de Bordeaux	Examineur
Mr Gérard Barroso, MCU, Université de Bordeaux	Directeur de thèse

Remerciements

Il me sera très difficile de remercier tout le monde; c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements les plus sincères à Gérard Barroso mon directeur de thèse pour avoir dirigé cette thèse et m'avoir permis de la réaliser dans les meilleures conditions. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

J'exprime ma gratitude à Jean-Michel Savoie directeur de l'unité de recherche MycSA, pour m'avoir accueilli dans l'équipe, de m'avoir permis de travailler dans d'aussi bonnes conditions. Egalement, pour le temps qu'il m'a consacré durant ces trois années, pour son accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité son aide.

Je voudrais exprimer tout particulièrement ma reconnaissance à Philippe Callac avec qui j'ai beaucoup appris et avec qui j'ai eu de la chance de découvrir le monde merveilleux des champignons. Tu m'a beaucoup supporté et est devenu un ami sur qui je peux compter. Je te souhaite santé et longue vie.

J'adresse également mes très sincères remerciements aux membres du jury: Pr. Fabienne Malagnac, Dr. Anne-Marie Farnet Da Sylva et Pr. Thiery Noel, d'avoir consacré du temps et accepter de juger mes travaux.

Merci au Pr. Mohammad Farsi de l'Université Ferdowsi de Mashhad, où j'ai été accueilli dans son laboratoire lors de mon travail expérimental en Iran.

Je remercie également, l'ensemble des personnes, qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail pour leur soutien logistique et moral, ainsi que pour la très bonne ambiance que j'ai toujours trouvée au laboratoire. Je pense tout particulièrement à Magalie, Nathalie, Thiery, Cathy, Christine et Enric.

Un spécial remerciement à Véronique, Marie-France et Corine. Merci pour votre disponibilité, cordialité et ainsi pour vos encouragements durant mes moments de stress et de doute.

Un remerciement est également adressé à Christophe, Marie, Vessela et Laetitia pour leurs aides et conseils.

Je remercie tous les étudiants (es) et ex-étudiants (es) de l'unité avec qui j'ai pu partager de très bons moments mais aussi les difficultés inhérentes à une thèse: Carlos, Linda, Manuela, Marie-Victoire, Mathilde, Aude, Idy, Alexandra, Benoît, Ccori, Léa et Mounia.

Ces remerciements seraient incomplets si je n'en adressais pas au personnel de l'INRA de Bourran. Mon travail de recherche sur le terrain a été particulièrement facilité par eux en particulière MM. Olivier Bègue et Dominique Monty.

Enfin, merci à toi, Mohammad Reza. Cette thèse t'est dédiée. Merci pour ton amour, ta patience et tes encouragements sans faille durant ces trois années difficiles de séparation.

Titre : Evolution intraspécifique du génome et modes de reproduction générateurs de diversité génétique chez *Agaricus bisporus*

Résumé : *Agaricus bisporus*, le champignon de Paris, est un basidiomycète saprophyte naturellement présent dans la litière de cyprès (*Cupressus macrocarpa*). Il possède différents modes de reproduction. Pour étudier leur rôle dans la dynamique spatio-temporelle et l'évolution de la diversité génétique au cours du temps, des dispositifs expérimentaux ont été mis en place. Dix souches sauvages d'*Agaricus bisporus* var. *bisporus* ont été sélectionnées, à partir de deux populations françaises, sur leurs traits phénotypiques et génotypiques. L'étude de l'évolution moléculaire de leurs génomes a montré que, pour le génome mitochondrial, la mobilité des introns de groupe I apparaît comme la principale source de polymorphisme. Des taux de substitution nucléotidique (nt) faibles ont été observés chez tous les types de séquences mitochondriales (éléments mobiles, séquences géniques et inter géniques). Cette forte conservation, comparée avec les taux élevés de substitution nt des séquences nucléaires similaires, contraste avec ce qui est généralement décrit dans l'évolution des séquences fongiques. Des expériences de croisements entre sporocarpes et mycelia de souches sauvages ont été menées sur du compost, dans une chambre de culture, pour simuler l'implantation d'une population naturelle. Pour les sporocarpes récoltés, les données montrent l'existence d'un phénomène parasexuel de Buller conduisant à des souches hybrides d'*A. bisporus* dans la chambre de culture et potentiellement dans la nature. Parallèlement, les mycelia de souches sauvages ont été introduits dans deux parcelles expérimentales de cyprès. L'analyse génotypique des sporocarpes récoltés la première année d'introduction n'a pas permis de mettre en évidence de souche hybride et les conditions climatiques de la seconde année n'ont pas permis d'obtenir de fructification. Les dispositifs et outils mis au point doivent permettre un suivi génétique spatio-temporel de la population sur le long terme.

Mots clés : Basidiomycota, Intron de groupe I, SNP, Population sauvage, Phénomène de Buller

Title: Intraspecific evolution of the genome and modes of reproduction generating genetic diversity in *Agaricus bisporus*

Abstract: *Agaricus bisporus*, the button mushroom, is a saprophytic basidiomycete naturally found in cypress litter (*Cupressus macrocarpa*). It possesses different modes of reproduction. To study their role in the spatio-temporal dynamics and in the evolution of the genetic diversity, experimental systems have been set up. Ten wild strains of *Agaricus bisporus* var. *bisporus* have been selected, from two french populations, on both phenotypic and genotypic traits. The molecular evolution of their genomes has shown that, for the mitochondrial genome, group I intron mobility was the main source of gene polymorphism. Low nucleotide (nt) substitution rates were found in all types of mitochondrial sequences (mobile elements, genic and intergenic ones). This stringent conservation of mitochondrial sequences, when compared with the high nt substitution rates of their nuclear counterparts, contrasts to what is widely accepted in fungal sequence evolution. Mating experiments between sporocarps and mycelia of wild strains were conducted on compost in a room culture, to simulate the implantation of a natural population. Among the collected sporocarps, results indicate the occurrence of a parasexual Buller phenomenon leading to hybrid strains of *A. bisporus* in room culture and putatively in the wild. In parallel, mycelia of the wild strains have been introduced in two experimental plots of cypress. Genotypic analysis of the sporocarps collected from these plots in the first year of introduction, failed to evidence a hybrid strain. The climatic conditions of the second year did not allow obtaining fruiting-bodies. The developed experimental systems and tools must allow a following at the genetic level of the spatio-temporal evolution of the population.

Keywords: Basidiomycota, group I intron, SNP, Wild population, Buller phenomenon

Unité de recherche

, INRA, UR1264, Mycologie et Sécurité des Aliments, CS20032, 33882 Villenave d'Ornon
Cedex, France

Abréviations

5.8S	RNA ribosomique 5.8S
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
BSN	Basidial Spore Number (Nombre de spores par baside)
CHEF	Clamped Homogeneous Electric Fields
cM	Centimorgan
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DO _{600nm}	Densité optique mesurée à une longueur d'onde de 600 nm
g	Accélération de la pesanteur
<i>heg</i>	Homing endonuclease gene
ITS	Internal Transcribed Spacer
J, h, min, s	Jour, heure, minute, seconde
kg, g, mg, µg, ng	Kilogramme, gramme, milligramme, microgramme, nanogramme
l, ml, µl	Litre, millilitre, microlitre
m, cm, mm	Mètre, centimètre, millimètre
M, mM, µM	Molaire, millimolaire, micromolaire
m ²	Mètre carré
nt	Nucléotide
°C	Degrés Celsius
ORF	Open Reading Frame (Cadre de lecture ouvert)
p/v	Poids (en g) par volume (en ml)
pb, Kpb	Paire de bases, Kilo paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction

pH	Potentiel hydrogène
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rpm	Rotation par minute
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
sp.	Espèce
v/v	Volume par volume
var.	Variété

Table des matières

Avant-propos	8
Introduction et Contexte bibliographie.....	10
I- <i>A. bisporus</i> (champignon de Paris): une espèce comestible d'intérêt industriel et scientifique	11
II- Position taxonomique	12
III- Variabilité des ressources génétiques utilisables dans les programmes de sélection chez <i>A. bisporus</i>	13
IV- Reproduction et cycle biologique d' <i>A. bisporus</i>	14
IV-1- Mycélium et reproduction végétative	15
IV-2- Reproduction sexuée	16
IV-2-1- L'hétérothallisme	16
IV-2-2- L'homothallisme	17
IV-3- Reproduction parasexuelle et recombinaison somatique	18
IV-3-1- Le phénomène de Buller	18
IV-3-2- La recombinaison somatique	18
V- <i>Agaricus bisporus</i> : une espèce avec des variétés aux cycles reproductifs différents.....	20
V-1- <i>A. bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	20
V-2- <i>A. bisporus</i> var. <i>burnettii</i>	21
V-3- <i>A. bisporus</i> var. <i>eurotetrasporus</i>	22
VI- Cytologie et processus méiotique chez <i>A. bisporus</i>	22
VII- Croisements et système d'incompatibilité sexuelle chez <i>A. bisporus</i>	26
VIII- Carte de liaison génétique et séquence du génome nucléaire d' <i>A. bisporus</i>	26
IX- Le génome mitochondrial d' <i>A. bisporus</i>	28
X- Structure génétique des populations sauvages d' <i>A. bisporus</i>	31
XI- Croisements et mode de vie pseudohomothallique dans la nature.....	34
XII- Présentation des travaux réalisés au cours de cette thèse	36
Chapitre 1: Sélection des souches d'<i>Agaricus bisporus</i> de l'étude.....	38
Chapitre 2: Evolution moléculaire intraspécifique des génomes nucléaires et mitochondriaux de souches sauvages d'<i>Agaricus bisporus</i>	43

Chapitre 3:Caractérisation de souches d'<i>Agaricus bisporus</i> à l'aide de marqueurs génotypiques en vue du suivi de leur comportement biologique dans leur milieu naturel ou en chambre de culture.....	44
I- Introduction.....	45
II- Matériels et Protocoles expérimentaux.....	46
II-1– Estimation quantitative du rendement de fructification.....	46
II-1-1- Préparation de la semence « blanc » sur des grains de blé	46
II-1-2- Protocole d'obtention des fructifications en chambre de culture	46
II-1-3- analyse statistique	47
II-2- Clonage moléculaire des produits de PCR dans bactérie <i>Escherichia coli</i>	47
II-2-1- Préparation de bactéries <i>E. coli</i> XL1-blue chimio-compétentes	47
II-2-2- Transformation des bactéries chimio-compétentes	48
II-3- Définition de marqueurs nucléaires de type CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)	49
III- Résultats	49
III-1- Sélection des souches sauvages à introduire dans les parcelles	49
III-2- Définition du génotype de chaque noyau porté par les trois souches hétérocaryotiques d' <i>A. bisporus</i> Bs177, Bs243 et Bs256	52
Chapitre 4: Etude de l'exposition de mycelia hétérocaryotiques d'<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i> à un nuage de basidiospores	54
Chapitre 5: Implantation et suivi du comportement biologique de souches d'<i>Agaricus bisporus</i> dans leur milieu naturel, la litière de cyprès.....	71
I- Introduction.....	72
II- Matériels et Protocoles expérimentaux.....	74
II-1- Caractérisation de mycelia présents dans les litières de cyprès avant l'implantation....	74
II-1-1- Approche microbiologique	74
II-1-1-1- Isolation de colonies mycéliennes à partir de la litière.....	74
II-1-1-2- Extraction d'ADN, PCR, séquençage et analyse des séquences	75
II-1-2- Approche moléculaire.....	75
II-1-2-1- Extraction d'ADN et amplification par PCR.....	75
II-1-2-2- Préparation de bactéries <i>Escherichia coli</i> XL1-blue chimio-compétentes.....	75
II-1-2-3- Transformation des bactéries chimio-compétentes	76
II-1-2-4- Extraction des plasmides et hydrolyse enzymatique par des endonucléases de restriction	77

II-2- Préparation des inocula fongiques à partir des souches d' <i>A. bisporus</i> sélectionnées.....	77
II-2-1- Souches, milieux et conditions de culture	77
II-2-2- Préparation des inocula d'implantation dans du compost commercial	78
II-3- Implantation des inocula d' <i>A. bisporus</i> dans les parcelles expérimentales	78
II-4- Prélèvement d'échantillons de sporocarpes, extraction d'ADN, PCR, séquençage et analyse des séquences	79
III- Résultats: Sélection, introduction et suivi des souches sauvages d' <i>A. bisporus</i> dans les parcelles expérimentales de cyprès.....	80
III-1- Etude préliminaire des espèces fongiques présentes dans la litière de cyprès des parcelles avant introduction des souches d' <i>A. bisporus</i>	80
III-2- Introduction des inocula d' <i>A. bisporus</i> dans les parcelles expérimentales	82
III-3- Caractérisation des sporocarpes d' <i>A. bisporus</i> récoltés sur les parcelles, après l'introduction des différentes souches dans les parcelles de cyprès	83
IV- Discussion	86
Conclusion et Discussion générale	87
Références bibliographiques	97
Annexes	106

Figures

Figure 1- Schéma montrant les trois modes de reproduction décrits chez l'espèce <i>A. bisporus</i>	20
Figure 2 - Schéma illustrant l'amphithallisme du cycle biologique d' <i>A. bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	20
Figure 3- Carte de liaison du génome d' <i>Agaricus bisporus</i> , basée sur les génotypes de 324 marqueurs dans une descendance de 118 homocaryon.....	26
Figure 4- Carte physique circulaire du génome mitochondrial d' <i>A. bisporus</i> var. <i>bisporus</i> souche H97	29
Figure 5- Représentation schématique de la région du génome mitochondrial d' <i>A. bisporus</i> var. <i>bisporus</i> souche H97 portant deux grandes séquences répétées inversées (IR)	29
Figure 1-1- Localisation géographique des régions de Saint-Malo (Dept. 35) et Lorient (Dept. 56) en région Bretagne (France).....	40
Figure 1-2- Arbre de Distance par la méthode du « neighbor-joining » réalisé sur 51 souches françaises d' <i>A. bisporus</i>	41
Figure 3-1- Différentes étapes de la préparation de la semence ou « blanc » et de la mise en fructification des souches en chambre de culture.....	47
Figure 3-2- Moyenne des rendements de fructification obtenus au cours des trois répétitions pour les 11 souches d' <i>A. bisporus</i>	50
Figure 3-3- comparaison d'un sporocarpie de couleur crème de la souche Bs243 et d'un sporocarpie de couleur brune de la souche Bs363	50
Figure 3-4- Hétéromorphismes dans les séquences obtenues par séquençage des amplifiats du marqueur ITS chez la souche Bs243 en positions nt 137 et nt 140	52
Figure 3-5- Représentation schématique du profil électrophorétique du produit de PCR ITS de différentes souches, après digestion enzymatique par endonucléase de restriction <i>Hae</i> III.....	53
Figure 3-6- Représentation schématique du profil électrophorétique du produit de PCR de la région 5' du gène <i>frk</i> de différentes souches, après digestion enzymatique par endonucléase de restriction <i>Hae</i> III	53
Figure 5-1- Photographie d'une des parcelles expérimentales de cyprès du domaine INRA de Bourran (Dept. 47) et d'un cyprès au moment de l'implantation des souches d' <i>A. bisporus</i>	73
Figure 5-2- Représentation schématique des sites de plantation des arbres dans les deux parcelles de cyprès, distantes de 50 m.....	82
Figure 5-3- Représentation schématique des parcelles expérimentales I (a) et II (b).	82
Figure 5-4- différentes étapes de l'introduction des inocula fongiques dans les parcelles.....	83
Figure 5-5- Photographies de sporocarpes, à différents niveaux de leur développement	84
Figure 5-6- Profils électrophorétiques des amplifiats PCR de la région ITS de l'unité ribosomique (amorces ITS4/ITS5) ou de la région 5' du gène <i>frk</i> (amorces PR6U/PR6R), après digestion enzymatique par <i>Hae</i> III, pour les souches étudiées	85
Figure 5-7- Utilisation d'amorces de l'intron <i>iAbi11</i> pour caractériser les haplotypes mitochondriaux des échantillons prélevés.	85
Figure D-1- Mécanisme de réparation basé sur la recombinaison homologue chez l'intron de groupe I.....	92

Tableaux

Tableau 1 - Position taxonomique d' <i>A. bisporus</i>	12
Tableau 1-1- Données moléculaires basées sur six marqueurs nucléaires de type microsatellite	40
Tableau 1-2- Données phénotypiques pour 49 souches d' <i>A. bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	41
Tableau 3-1- Comparaison multiple des moyennes de rendement de fructification à l'aide du test statistique de Tukey (avec un indice de confiance de 95,0 %)	50
Tableau 3-2- variabilité nucléotidique de la région de l'unité ribosomique ITS1/5.8S/ITS2 ..	51
Tableau 3-3- variabilité nucléotidique de la région amplifiée du gène <i>frk</i>	51
Tableau 5-1- Nom et origine des souches et espèces d' <i>Agaricus</i> utilisées pour l'implantation des parcelles expérimentales	77
Tableau 5-2- Espèces fongiques détectées dans les échantillons de litière par l'approche microbiologique	80
Tableau 5-3- Espèces fongiques détectées dans les échantillons de litière par l'approche moléculaire	81
Tableau 5-4- Récapitulatif des profils de digestion par <i>HaeIII</i> des amplifiats PCR ITS et <i>frk</i> ainsi que la caractérisation de l'haplotype mitochondrial à l'aide du marqueur constitué par la taille du produit PCR amplifié avec les amorces ciblant l'intron mitochondrial <i>iAbi11</i> du gène <i>cox1</i> pour 48 échantillons de sporocarpes prélevés sur les parcelles	84

Avant-propos

Agaricus bisporus (J. E. Lange, 1926) Imbach (1946) communément appelé champignon de Paris, est un champignon de la division des Basidiomycota. Il représente non seulement l'un des espèces comestibles les plus cultivées dans le monde, mais aussi un organisme modèle de champignon saprophyte, décomposeur de litière. C'est dans ce contexte que son génome a été récemment séquencé (Morin et al. 2013). De plus, les trois principaux modes de reproduction sexuée décrits chez les champignons: hétérothallisme, homothallisme et pseudohomothallisme coexistent dans différentes variétés et souches sauvages de cette espèce. Cependant, en dépit des nombreuses connaissances établies en conditions de laboratoire sur la biologie des souches sauvages et cultivées d'*A. bisporus*, les moteurs de la reproduction et de la propagation de cette espèce dans la nature sont encore peu connus. *A. bisporus* semble donc être un bon modèle pour étudier l'invasissement d'un écosystème naturel par un champignon basidiomycete saprophyte et l'évolution spatio-temporelle de ses populations sauvages.

Au cours de cette thèse, nous nous proposons d'étudier, d'une part, les modalités d'évolution intraspécifique des génomes nucléaires et mitochondriaux d'*A. bisporus* et, d'autre part, les mécanismes impliqués dans la reproduction et la propagation des populations d'*A. bisporus* dans la nature.

Dans la partie introductive de cette thèse, les principales connaissances rapportées dans la littérature sur le modèle biologique de notre étude (*A. bisporus*) seront présentées, en particulier, celles concernant son génome, ses cycles de vie et la structure des populations sauvages de ce champignon saprophyte.

Introduction et Contexte bibliographique

I- *A. bisporus* (champignon de Paris): une espèce comestible d'intérêt industriel et scientifique

Le champignon de Paris, *A. bisporus*, est l'une des espèces comestibles les plus cultivées dans le monde. Elle a été domestiquée pour la première fois en France, qui reste un important producteur derrière la Chine (Chang, 2005), les Etats-Unis (U.S. Department of Agriculture, « USDA »), la Pologne et les Pays-Bas (Groupement Européen des Producteurs de Champignons « GEPC »). *A. bisporus* qui représente une part importante de l'alimentation humaine depuis plus de 200 ans est à l'origine d'une culture industrielle générant plusieurs milliards de dollars au niveau mondial (Morin et al. 2012).

Outre son intérêt en tant que champignon comestible cultivé, *A. bisporus* est devenu une espèce modèle pour l'étude des basidiomycètes de pourriture blanche décomposeurs de litière et son génome a été récemment séquencé afin de préciser les déterminants génétiques liés à ce mode de vie nécrotrophe (Morin et al. 2012). Ce champignon saprophyte humicole est plutôt rare dans la nature mais relativement bien représentées sur certains substrats comme les litières forestières composées par les aiguilles d'arbres, appartenant principalement au genre *Cupressus* et *Picea*, mais aussi sous *Prosopis* sp. ou *Tamarix* sp. dans des lieux arides et des dunes côtières. Il peut aussi être rencontré sur des déchets végétaux plus ou moins enrichis en matière organique comme le compost (Callac et al. 1994; Kerrigan et al. 1995b). *A. bisporus* apparaît ainsi comme un faible compétiteur sur les déchets végétaux frais et non dégradés mais bien adapté à une matière végétale partiellement décomposée comme certaines litières forestières ou encore des sols de prairies riches en substrats humiques, qui constituent des niches écologiques où *A. bisporus* et d'autres espèces d'Agaricaceae peuvent croître et fructifier en abondance et même souvent prédominer (Morin et al. 2012).

Il faut noter que cette espèce peut utiliser différents modes de reproduction (asexuée, sexuée ou para sexuée décrits dans le paragraphe IV de cette introduction), ce qui est en faveur d'une importante capacité de cet organisme à s'adapter rapidement aux changements environnementaux.

Tableau 1 - Position taxonomique d'*A. bisporus*

Règne	Fungi
Division	Basidiomycota
Classe	Hymenomycetes
Ordre	Agaricales
Famille	Agaricacea
Genre	<i>Agaricus</i>
Espèce	<i>bisporus</i>

II- Position taxonomique

Le tableau 1 montre la position taxonomique d'*A. bisporus*. Depuis le début de la culture du champignon de Paris, le nom scientifique de cette espèce a été l'objet de nombreux débats et de discussions animées chez les mycologues. Au début, l'espèce cultivée a été rattachée à une espèce commune dans les prairies: *Agaricus campestris*; cependant, il est aujourd'hui clairement établi qu'il s'agit de deux espèces distinctes et phylogénétiquement éloignées (Malloch et al. 1987).

En 1967, Isaacs a rapporté que le champignon de Paris appartenait à la même espèce que celle des holotypes d'*Agaricus brunnescens*, décrite en 1900 par Peck. Cependant, la synonymie des deux espèces s'est heurtée à l'opposition de nombreux mycologues comme Singer (1984) pour qui *A. bisporus* et *A. brunnescens* sont deux espèces distinctes. L'utilisation de RFLP d'ADN nucléaire et mitochondrial a une nouvelle fois confirmé la co-spécificité d'*A. bisporus* et *A. brunnescens* (Malloch et al. 1987), montrant que la variabilité génétique entre les "deux" espèces n'était pas supérieure à celle observée entre deux souches cultivées d'*A. bisporus*. Il semble, ainsi, que le débat sur le nom d'espèce du champignon de Paris ait été résolu en faveur d'*A. brunnescens*, mais que *A. bisporus* soit susceptible de rester en service car constituant le nom le plus couramment rencontré dans la littérature (Kerrigan, 1987).

De plus, de nombreuses questions subsistent quant à la position phylogénétique d'*A. bisporus*, et en particulier sur les relations entre cultivars et populations sauvages de cette espèce. (Bunyard et al. 1996).

III- Variabilité des ressources génétiques utilisables dans les programmes de sélection chez *A. bisporus*

Les progrès réalisés dans les programmes de sélection d'*A. bisporus* ont toujours été entravés par deux handicaps majeurs spécifiques à cette espèce. Le premier est la faible quantité des ressources génétiques disponibles chez les souches cultivées (Royse et May, 1982). Le second handicap est lié au cycle de vie particulier de cette espèce qui limite les possibilités de croisement. En effet, la caractéristique la plus problématique de cette espèce est sa tendance à produire des descendants majoritairement fertiles qui conservent presque tous le même génotype parental hétérocaryotique (Allen et al. 1990).

L'important développement industriel de cette espèce contraste avec la rareté des connaissances sur le comportement des souches sauvages dans leur biotope naturel. La culture du champignon de Paris joue un rôle important dans l'économie de nombreux pays. En conséquence, les populations sauvages d'*A. bisporus* représentent des ressources génétiques précieuses qu'il est pertinent de recueillir et de préserver des risques potentiels que représentent l'invasion et l'introggression de cultivars.

Dans les années 80, des efforts ont été développés pour comprendre la diversité des populations naturelles de cette espèce, leurs modes de reproduction, les relations entre souches, ainsi que les processus dynamiques susceptibles de modifier et menacer les populations naturelles (Kerrigan et Ross, 1989, Kerrigan, 1990).

Ainsi, un effort a été réalisé pour collecter diverses variétés d'*Agaricus* dans le cadre du programme ARP (*Agaricus* Recovery Program) fondé par Kerrigan et rebaptisé plus tard *Agaricus* Resource Program. Des centaines de souches d'*A. bisporus*, incluant de nombreuses souches sauvages sont disponibles avec l'ARP. La plupart de ces souches ont été recueillies auprès de grandes entreprises de semence « (blanc) » et d'instituts de recherche du monde entier.

En 1990, un programme de sélection mené par l'INRA et le CTC (Centre Technique du Champignon de couche) a commencé sur *A. bisporus* avec la création du Germoplasme des Agarics à Bordeaux (CGAB) rassemblant de nombreuses souches sauvages provenant de nombreux pays. Dans ce cadre, une collection d'environ 200 isolats français provenant de 44 sites géographiques différents a été recueillie et évaluée pour leur variabilité génétique et phénotypique. Un polymorphisme génétique élevé a été observé, même au sein de chaque population géographique. La variabilité a été observée pour des caractères comme la couleur de chapeau, la sensibilité à la « tâche bactérienne » ou le nombre de spores par baside. Un seul isolat (Bs261) a montré des sporocarpes avec une majorité de basides tetrasporées. Cette souche était interfertile avec des souches bisporées typiques et les hybrides résultant étaient soit bisporés ou tetrasporés en fonction des homocaryons utilisés dans les croisements. Ainsi, les nouvelles ressources génétiques françaises, comprenant de rares isolats tetrasporés, ont ouvert un nouvel horizon dans les programmes de sélection de cette espèce (Callac, 1995). Ces souches, avec d'autres isolats tetrasporés trouvés dans le désert californien (*A. bisporus* var. *burnettii*, Callac et al. 1993) permettent de produire aisément des souches homocaryotique et d'exploiter l'hétérosis en développant des souches hybrides.

IV- Reproduction et cycle biologique d'*A. bisporus*

A. bisporus est un modèle intéressant pour l'étude des différents modes de reproduction chez les champignons parce que différents cycles de reproduction co-existent dans les différentes souches et variétés de cette espèce: la reproduction végétative qui produit, par mitose, un mycélium génétiquement identique à l'organisme parental, la reproduction sexuée qui, grâce à la méiose génère des individus génétiquement différents des parents et d'autres processus regroupés sous le nom de reproduction parasexuée. Ces modes de reproduction ont une influence majeure

sur la structure génétique des populations. Dans ce contexte, la compréhension des systèmes de reproduction donne des informations de base pour la gestion des ressources naturelles.

IV-1- Mycélium et reproduction végétative

Le mycelium végétatif d'*A. bisporus* est constitué par un ensemble de filaments (ou hyphes) envahissant les zones superficielles du sol ou du substrat. Comme de nombreux champignons comestibles, *A. bisporus* peut être propagé par bouturage (multiplication végétative). Dans ce procédé, de petits fragments de mycélium végétatif hétérocaryotique sont prélevés et utilisés pour inoculer des substrats riches en matières organiques et ainsi générer de nouveaux mycéliums pouvant différencier les organes de fructification ou sporocapes (produit consommé).

Le mycélium d'*A. bisporus* peut être homocaryotique (n) ou hétérocaryotique ($n + n$), mais dans les deux cas, les articles sont dépourvus d'anses d'anastomose et multinucléés avec un nombre variable de noyaux (Saksena et al. 1976, Kamzolkina et al. 2006). Bien qu'aucune spore de multiplication végétative ou asexuée n'ait été mise en évidence chez *A. bisporus*, des fragments de mycélium pourraient avoir un rôle dans la dissémination de cette espèce. En effet, il a été montré que des fragments de mycélium pouvaient contaminer un autre mycélium en lui transmettant un virus (Grogan et al. 2003) après anastomose. L'anastomose entre deux mycéliums semble permettre non seulement un échange de noyaux, mais aussi de mitochondries et d'autres composants intracellulaires.

L'anastomose peut se produire entre hétérocaryons génétiquement différents et permettre alors des échanges trophiques dans les cas suivants: (1) Lors de la transplantation expérimentale de sporophores au contact d'un mycélium receveur (Sinden et al 1962); (2) en co-culture expérimentale d'un mycélium homocaryotique avec des spores, produisant ainsi de nombreux sporophores hybrides génétiquement différents sur le même plateau de compost (Callac et al 2006.); (3) dans certains

procédés de culture (agglomérat) au cours desquels du mycélium de champignon sous forme de semence appelée « blanc » est ajouté à la terre de gobetage.

De façon intéressante, il a été récemment montré que l'utilisation d'un mycélium transgénique envahissant le compost et recouvert par une terre de gobetage contenant un mycélium sans transgène conduisait à l'apparition de sporophores présentant le phénotype transgénique, mais dont les noyaux sont dépourvus du transgène (Woolston et al. 2011).

L'anastomose semble jouer un rôle majeur dans le cycle de vie d'*A. bisporus*: elle peut se produire (1) entre homocaryons sexuellement compatibles et permet ainsi l'apparition d'un hétérocaryon (évènement de plasmogamie dans le cas d'un cycle hétérothallique), (2) entre un homocaryon et un hétérocaryon et, dans ce cas, le nouvel hétérocaryon porte le noyau de l'homocaryon parental et un noyau sexuellement compatible provenant de l'hétérocaryon, et (3) entre deux hétérocaryons. Dans ce dernier cas, la formation d'un nouvel hétérocaryon génétiquement différent n'a pas été mis en évidence, mais ne peut être totalement exclu car Xu et al. (1996) ont détecté des recombinants somatiques issus de croisements hétérocaryon x hétérocaryon mais aussi hétérocaryon x homocaryon.

IV-2- Reproduction sexuée

IV-2-1- L'hétérothallisme

La majorité des champignons basidiomycètes filamenteux ont développé des systèmes génétiques limitant l'autofécondation, appelés systèmes d'incompatibilité sexuelle. Ainsi chez ces espèces dites hétérothalliques, la fécondation (plasmogamie) entre deux souches n'est possible que si elles possèdent des facteurs d'incompatibilité sexuelle différents. L'hétérothallisme peut exister sous deux formes principales: l'hétérothallisme bipolaire et l'hétérothallisme tétrapolaire. La première

forme repose sur l'existence d'un seul facteur génétique d'incompatibilité alors que la seconde implique deux facteurs d'incompatibilité génétiquement indépendants (Whitehouse, 1949).

IV-2-2- L'homothallisme

Chez les espèces homothalliques, la germination d'une basidiospore génère un mycélium capable de fructifier en l'absence de tout croisement avec un individu génétiquement différent. Ainsi, un cycle complet de reproduction sexuée (fécondation, meiose) peut être réalisé à partir d'une seule basidiospore. Sur la base du nombre de basidiospores portées par la baside et de l'existence ou pas de facteur(s) d'incompatibilité, l'homothallisme peut être divisé en deux formes dites primaire et secondaire.

a. Homothallisme primaire: Dans l'homothallisme primaire, le mycélium généré par la germination d'une seule spore haploïde contenant un seul noyau post-méiotique, est capable de fructifier et générer à son tour des basidiospores haploïdes après meiose. Ce phénomène a été observé, par exemple, chez le champignon comestible cultivé *Volvariella volvacea* ou champignon de la paille de riz (Whitehouse, 1949).

b. Homothallisme secondaire (Pseudohomothallisme): Les espèces homothalliques secondaires possèdent un système d'incompatibilité sexuelle similaire à celui des espèces hétérothalliques bipolaires. Cependant, chez ces espèces, les basides formées, après meiose portent deux spores associant chacune deux noyaux post-meiotiques sexuellement compatibles. La germination de chacune de ces spores peut générer un mycélium hétérocaryotique capable à son tour de fructifier. Ce phénomène a été appelé pseudohomothallisme ou homothallisme secondaire (Whitehouse, 1949).

IV-3- Reproduction parasexuelle et recombinaison somatique

L'échange de matériel génétique et les phénomènes de recombinaison ne sont pas nécessairement limités au cycle de reproduction sexuée. Chez de nombreuses espèces, un hétérocaryon est en mesure de fournir un noyau compatible à un homocaryon dans un processus connu sous le nom de phénomène de Buller (Raper, 1966). Il a été également montré que des échanges génétiques pouvaient se produire entre hétérocaryons par un phénomène connu sous le nom de recombinaison somatique (Xu et al. 1996).

IV-3-1- Le phénomène de Buller

Lors du phénomène de Buller (Buller, 1931), une anastomose (plamogamie) entre un homocaryon et un hétérocaryon produit un hétérocaryon hybride qui reçoit le noyau de l'homocaryon et l'un des deux noyaux de l'hétérocaryon. Ce dernier doit être sexuellement compatible avec le noyau de l'homocaryon (Callac et al. 2006). Ce processus a été décrit chez plusieurs basidiomycètes et est généralement accompagné d'une migration du noyau de l'hétérocaryon dans les hyphes de l'homocaryon receveur. L'existence du phénomène de Buller a été montré chez *A. bisporus*, mais il n'existe aucune preuve d'une migration nucléaire chez cette espèce (Raper et al. 1972).

IV-3-2- La recombinaison somatique

Les cellules ou articles des hyphes d'*A. bisporus* sont multinucléés et il n'y a pas de preuve claire d'un appariement physique entre les deux types nucléaires gamétiques (parentaux). Comme (1) la plupart des basidiospores d'*A. bisporus* (var. *bisporus*) sont hétérocaryotiques et que (2) la possibilité d'existence dans la nature et pour des périodes de temps prolongées de mycélia hétérocaryotiques est élevée, on peut émettre l'hypothèse d'une fréquence élevée de rencontres entre mycélia hétérocaryotiques. A l'inverse, la rencontre d'un homocaryon avec un autre homocaryon ou

avec un hétérocaryon semble faible (Xu et al. 1996). A l'heure actuelle, la fréquence des croisements entre homocaryons dans les populations sauvages d'*A. bisporus* est inconnue.

Pour tester l'hypothèse de croisements impliquant deux hétérocaryons ou un hétérocaryon et un homocaryon chez *A. bisporus* var. *bisporus*, Xu et al. (1996) ont recherché l'existence d'événements de recombinaison somatique pouvant survenir au cours de ces deux types d'interaction. Ils ont pu observer une fréquence élevée de recombinaisons somatiques au cours de ces croisements. Plusieurs des recombinants analysés ont fourni des preuves sans équivoque de l'existence de crossing-over entre loci génétiquement et physiquement liés (Xu et al. 1996).

Les mécanismes génétiques responsables de la recombinaison somatique chez *A. bisporus* sont inconnus. Pour Xu et al. (1996), la recombinaison somatique se produirait après une fusion de deux noyaux consécutive à l'anastomose des hyphes. Il se produirait alors des crossing-over et/ou des pertes de chromosomes au cours de cycles successifs de mitoses. Selon eux, la recombinaison somatique pourrait être facilitée par la présence de trois ou quatre génotypes nucléaires différents dans le même cytoplasme. En effet, aucune recombinaison somatique n'a été observée dans les sous-cultures issues d'auto-appariement entre isolats.

Généralement, les croisements entre homocaryons sont supposés jouer un rôle majeur dans la reproduction (sexuée) des basidiomycètes. Dans ce contexte, l'existence d'évènements fréquents de recombinaison somatique, observés au cours de croisements entre souches d'*A. bisporus*, constitue une observation surprenante qui soulève la question de la fréquence et du rôle des échanges génétiques entre mycélia végétatifs hétérocaryotiques dans la nature et celle de la part jouée par cette recombinaison somatique dans la structuration des populations sauvages de basidiomycètes (Xu et al. 1996).

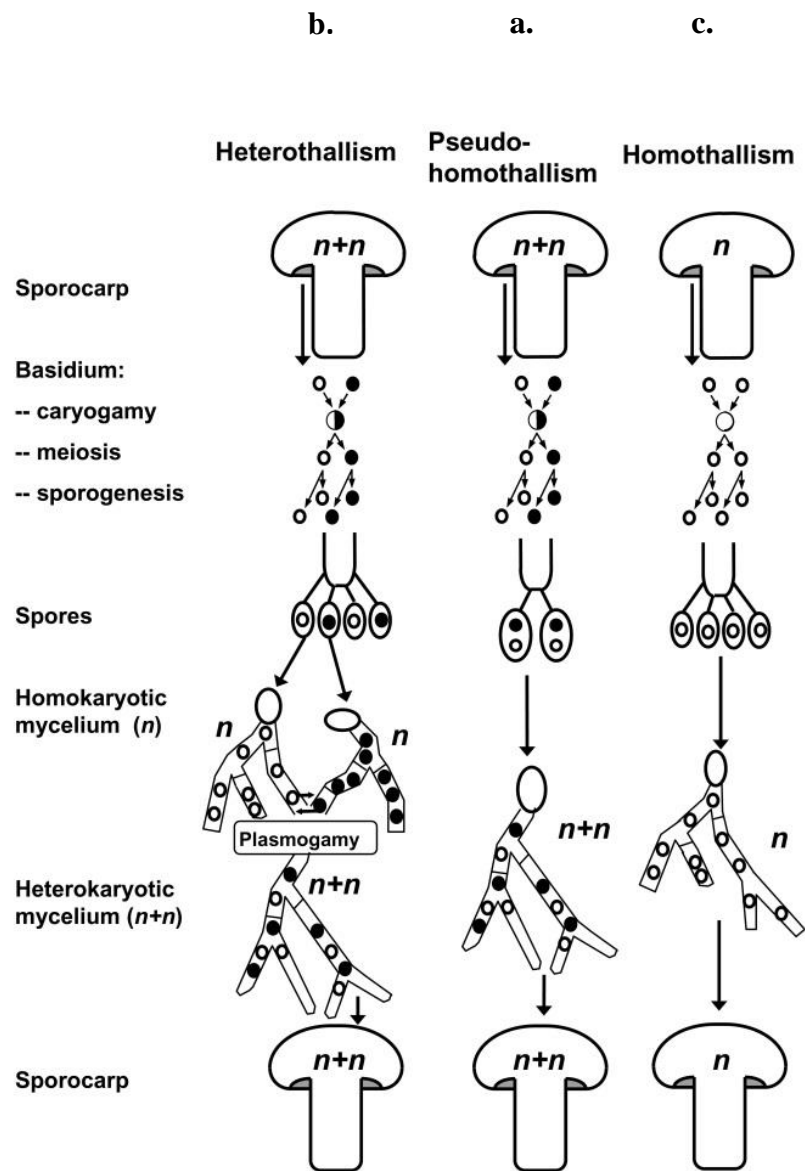


Figure 1- Schéma montrant les trois modes de reproduction décrits chez l'espèce *A. bisporus*. Pseudohomothallisme prédominant dans la var. *bisporus* (a) ; Hétérothallisme prédominant dans la var. *burnettii* (b); homothallisme prédominant dans la var. *eurotetrasporus* (c) (d'après Savoie et al. 2013)

V- *Agaricus bisporus*: une espèce avec des variétés aux cycles reproductifs différents

Trois variétés existent chez l'espèce *A. bisporus* qui regroupe ainsi les trois principaux types de reproduction sexuée connus chez les basidiomycètes (pseudohomothallisme, hétérothallisme et homothallisme) (Fig. 1).

V-1- *A. bisporus* var. *bisporus*

Cette variété a un système d'incompatibilité sexuelle unifactoriel multiallélique (Miller et Kananen 1972). Ce locus d'incompatibilité, appelé locus MAT (Xu et al. 1993a), possède 14 allèles (Kerrigan et al. 1994, Imbernon et al. 1995). Cependant, le cycle biologique de cette variété est amphithallique, allant du pseudohomothallisme (= homothallisme secondaire) à l'hétérothallisme, en fonction du niveau de ploïdie des spores qui peuvent être respectivement hétérocaryotiques ($n + n$) ou homocaryotiques (n) (Kühner 1977) (fig. 2).

Dans la variété *A. bisporus* var. *bisporus*, la plupart des basides sont bisporées et produisent des spores hétérocaryotiques qui lui confèrent un cycle de reproduction où le pseudohomothallisme est dominant (Raper et al. 1972). Plus précisément, l'étude de 215 isolats sauvages français (Callac et al. 1996) a montré que les pourcentages moyens de basides bi, tri et tetrasporées étaient respectivement de 81, 18, et 1%. Le pourcentage de descendants homocaryotiques, variait entre 1 et 10%. Il faut noter que ce pourcentage peut être affecté par différents éléments. En effet, (1) les pourcentages de basides bi, tri et tétra-sporées varient en fonction non seulement de facteurs génétiques, mais aussi des conditions environnementales (Kerrigan et Ross, 1987), (2) l'état de ploïdie des spores issus de basides tri-sporées n'est pas connu, et (3) le nombre de spores homocaryotiques capables de germer et générer un mycélium homocaryotique peut être diminué par la présence d'allèles récessifs létaux ou délétères. Cependant, même avec un taux de germination des spores

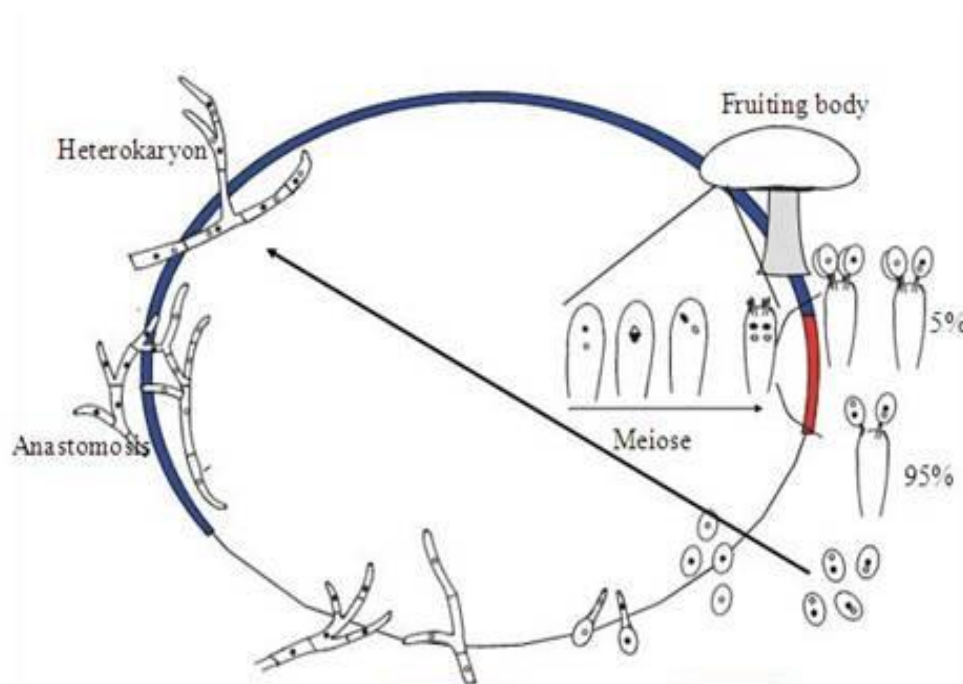


Figure 2 - Schéma illustrant l'amphithallisme du cycle biologique d'*A. bisporus* var. *bisporus* (d'après Sonnenberg, 2011)

faible, le nombre de spores haploïdes donnant naissance à un mycélium homocaryotique incapable de fructifier n'est pas négligeable si l'on considère qu'un seul sporophore produit plus d'un milliard de spores.

Ces mycéliums homocaryotiques sont à l'origine d'un cycle de reproduction typiquement hétérothallique, où la plasmogamie entre deux homocaryons sexuellement compatibles restaure un hétérocaryon fertile. Cet aspect du cycle est utilisé dans les programmes d'amélioration génétique classiques. En revanche, les spores hétérocaryotiques donnent naissance à des hétérocaryons directement fertiles.

La plupart des isolats provenant de populations sauvages et toutes les souches cultivées appartiennent à cette variété *A. bisporus* var. *bisporus*. L'enrichissement des collections de ressources génétiques en souches sauvages au cours des deux dernières décennies a permis d'élargir et d'affiner le concept d'espèce *A. bisporus*. Sur la base d'études morphologiques et génétiques, deux nouvelles variétés d'*A. bisporus* ont été décrites chez cette espèce.

V-2- *A. bisporus* var. *burnettii*

La variété *A. bisporus* var. *burnettii*, a été décrite à partir d'isolats récoltés dans le désert de Sonoran en Californie (Callac et al. 1993). La majorité des basides portées par les sporophores de cette variété sont tetrasporées et, en conséquence son cycle de vie est principalement hétérothallique (Kerrigan et al. 1994). Il a été montré que le nombre moyen de spores par baside est principalement déterminé par un locus génétique nommé BSN (basidial spore number), lié au locus d'incompatibilité sexuelle MAT sur le chromosome I (Imbernon et al. 1995, 1996, Callac et al. 1997). A ce jour, la variété *A. bisporus* var. *burnettii*, complètement inter-fertile avec la var. *bisporus*, n'a été isolée que dans le désert californien.

V-3- *A. bisporus* var. *eurotetrasporus*

Cette variété a été décrite à partir de rares isolats tétrasporiques trouvés en France et en Grèce (Callac et al. 2003). Le cycle de vie de cette variété est homothallique: les sporophores (homocaryotiques) produisent des spores haploïdes donnant naissance à des filaments mycéliens homocaryotiques fertiles. Les basides sont principalement tétrasporées comme chez la var. *burnettii*. Cette variété est interfertile à la fois avec les représentants des variétés *bisporus* et var. *burnettii* et la plupart des basides des hybrides sont tétrasporées. Il a été montré que les variétés *eurotetrasporus* et *burnettii* portaient au locus BSN un allèle dominant, nommé Bsn-t responsable du caractère tétrasporé des basides. Cependant, les liens phylogénétiques entre ces deux variétés sont encore inconnus.

Il est classiquement admis que, chez les variétés hétérothalliques (var. *burnetti* et pour une partie var. *bisporus*), l'existence de méiospores haploïdes permettrait l'élimination des mutations délétères et contribuerait ainsi au « fitness » (ou adaptation) de l'espèce (Bruggeman et al. 2003). En conséquence, la présence de basides tétrasporées pourrait offrir à la souche un meilleur « fitness » que les basides bisporées. En raison de leur capacité de fructification haploïde et en raison de l'absence d'allèles récessifs létaux, qui sont fréquents chez la variété *bisporus*, les souches de la variété *eurotetrasporus* montrent un intérêt potentiel pour des études génétiques et des programmes de sélection. Il faut noter que l'hybridation entre une souche de la variété *eurotetrasporus* et une var. *bisporus* a été décrite dans la nature (Callac et al. 1998) et peut aussi être facilement réalisée *in vitro* (Kamzolkina et al. 2006).

VI- Cytologie et processus méiotique chez *A. bisporus*

Comme nous l'avons vu, le système de reproduction sexuée chez *A. bisporus* var. *bisporus* présente de nombreuses particularités par rapport à la plupart des champignons des divisions

Ascomycota et Basidiomycota (Dikarya). En effet, la plupart des basides sont bisporées, chacune des deux spores recevant deux des quatre produits haploïdes de la méiose. L'emballage des noyaux dans les spores n'est pas aléatoire. Le plus souvent, les noyaux non-sœurs sont emballés après la méiose II (Summerbell et al. 1989) et la plupart des marqueurs génétiques se séparent lors de la méiose I (Summerbell et al 1989; Kerrigan et al 1993b). La conséquence de ce système est que plus de 90% des basidiospores produites restent hétérozygotes pour les loci déjà hétérozygotes dans l'hétérocaryon parental (Allen et al. 1992). En particulier, la plupart des spores donnent naissance à des mycéliums hétérocaryotiques présentant une hétérozygotie du locus d'incompatibilité MAT et qui sont donc capables de fructifier. Ainsi, ce mode de reproduction se traduit par le maintien de l'hétérozygotie parentale de générations en générations et par une faible fréquence des changements génétiques. Une minorité de basides ont cependant trois ou quatre spores, dont certaines homocaryotiques et auto-stériles (Elliott 1972; Raper et al 1972; Kerrigan, 1993b).

Des études cytologiques menées sur des basides bisporées d'*A. bisporus* ont montré que, les divisions nucléaires faisant suite à la caryogamie possèdent les caractéristiques des divisions méiotiques et que la plupart des spores reçoivent deux noyaux filles de chaque tétrade (Saksena et al. 1976). Dans l'hypothèse d'une répartition aléatoire de l'hétéroallélisme parental, le nombre de loci hétéroalléliques de la descendance devrait approcher 0.667^n , où n représente le nombre de marqueurs indépendants étudiés (Langton et Elliott, 1980; Kerrigan 1989). La valeur observée montre cependant une très forte conservation de l'hétéroallélisme parental, suggérant que la plupart des basidiospores ne proviendraient pas d'événements méiotiques (Allen et al. 1990).

Le nombre (n) de chromosomes d'*A. bisporus* a été initialement estimé par Evans (1959) égal à 12, sur la base d'une étude de microscopie optique et un appariement des noyaux non-sœurs au cours de la sporogénèse a été déduit d'observations sur l'orientation du fuseau de division par rapport à la géométrie de la baside (Evans, 1959).

De 1972 à 1991, plusieurs études ont été réalisées pour démontrer le comportement méiotique d'*A. bisporus* avec seulement deux ou trois marqueurs (Raper et al. 1972; Spear et al. 1983; Wang et al. 1991). Une analyse détaillée du comportement du matériel génétique au cours de la genèse des basidiospores a été réalisée par Kerrigan et al. (1993b). Cette étude a fourni 64 marqueurs génétiques, répartis sur une carte couvrant l'ensemble du génome d'*A. bisporus*. Plusieurs groupes de liaison génétique distincts ont été identifiés et assignés à des chromosomes.

L'hybridation selon Southern de marqueurs moléculaires utilisés comme sonde avec les chromosomes de deux homocaryons d'*A. bisporus* séparés par électrophorèse en champs pulsés (CHEF) a montré que le nombre définitif de chromosomes de cette espèce est égal à $n = 13$ (Kerrigan et al. 1993b).

L'absence de recombinaison observée chez plusieurs groupes de marqueurs suggère que soit les événements de crossing-over sont rares dans certaines régions du génome ou que ces événements de recombinaison entraînent une létalité des descendants.

En résumé, les résultats obtenus montrent que, malgré l'homothallisme secondaire de l'espèce et la transmission élevée des loci hétérozygotes des génotypes parentaux à la descendance, *A. bisporus* est capable d'effectuer des méioses de type conventionnel au cours desquelles des assortiments indépendants et une ségrégation des marqueurs se produisent, mais où les événements de crossing-over sont rares (Kerrigan et al. 1993b).

La preuve de l'appariement préférentiel de noyaux non-sœurs a été montrée par l'observation que les «sister progeny» issues de la seconde division méiotique, représentaient moins de 0,5% des hétérocaryons, alors que, dans le cas d'un appariement aléatoire, elles devraient représenter un tiers des descendants hétérocaryotiques (Kerrigan et al. 1993b).

Une sélection des descendants basée sur l'auto-fertilité des spores favorise les mécanismes qui maintiennent l'hétérozygotie au niveau du locus MAT. Il est connu que les centromères sont associés à des régions de faible recombinaison (White, 1973). Dans l'hypothèse où le locus MAT est situé à

proximité d'un centromère, la ségrégation préférentielle de paires de noyaux non-soeurs dans les spores expliquerait le maintien de l'hétéroallélisme à un niveau plus élevé que prévu (Kerrigan et al. 1993b).

Une étude comparative de la méiose chez les trois variétés décrites dans l'espèce *A. bisporus* a été réalisée par Kamzolkina et al. (2006). Selon cette étude, le comportement des noyaux est caractérisé par les quatre éléments suivants:

(1) les quatre noyaux postméiotiques ne migrent pas vers le centre de la baside. Cependant, Stepanova et Vassiliev (1994) ont montré que, chez d'autres Agaricales, les noyaux migraient de l'apex vers le centre de la baside après la première division de la méiose puis retournaient à l'apex avant la deuxième division de la méiose. Les quatre noyaux postméiotiques migrent alors à nouveau vers le centre de la baside et y demeurent jusqu'à leur migration vers les spores. Le même phénomène a été observé par Ross et Margalith (1987) chez *Coprinus bilanatus* et par Kamada et Tanabe (1995) chez *Coprinus cinereus*. (2) La formation des stérigmates n'est pas synchronisée avec un stade particulier de la méiose (Evans, 1959). Généralement, ces derniers sont formés précocement vers la fin de la première division de la méiose et même, dans certains cas, au cours de la prophase I. (3) les divisions de la méiose sont souvent asynchrones (sauf chez la variété *eurotetrasporus*). (4) tous les produits postméiotiques migrent dans les spores, même si une mitose supplémentaire se produit dans la baside. Ainsi, *A. bisporus* diffère d'autres espèces chez lesquelles certains noyaux demeurent dans la baside puis y dégénèrent après maturation complète des spores. On peut supposer que, dans les basides bisporées, l'ensemble de ces propriétés offrent des conditions permettant la migration de deux noyaux non-sœurs dans chaque stérigmate (Dunkan et Galbraith 1972, Stepanova et Vasilyev 1994, Kuhner 1977, Evans 1959).

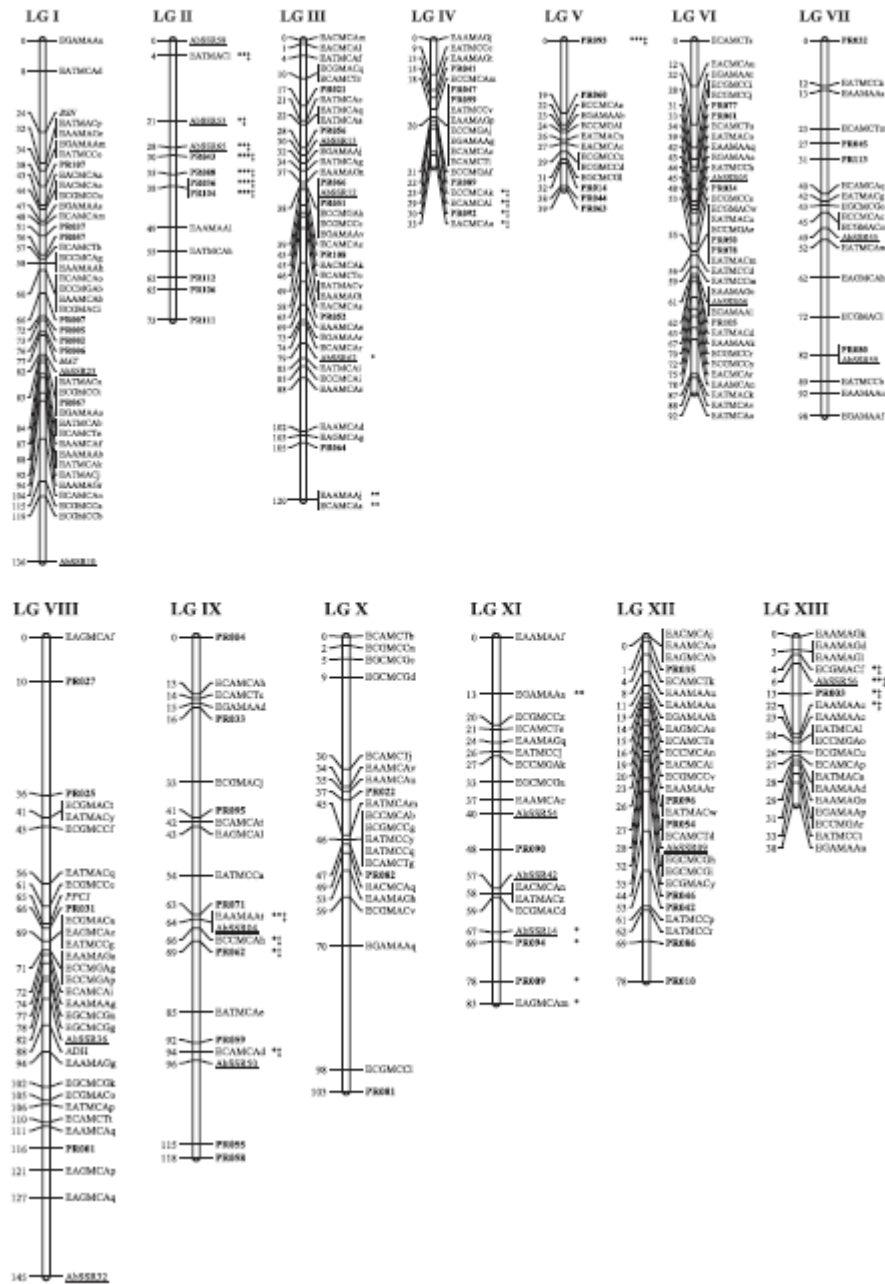


Figure 3- Carte de liaison du génome d'*A. bisporus*, basée sur les génotypes de 324 marqueurs dans une descendance de 118 homocaryon (d'après Foulongne-Oriol et al. 2010)

VII- Croisements et système d'incompatibilité sexuelle chez *A. bisporus*

Les gènes d'incompatibilité sexuelle sont impliqués dans la formation d'un dicaryon par plasmogamie de deux mycéliums homocaryotiques. Ces gènes constituent donc des marqueurs importants dans les programmes d'amélioration du Champignon de Paris (Kothe 2001). *A. bisporus* possède un système d'incompatibilité sexuelle unifactoriel (Eliott 1972; Miller 1971; Raper et Kay, 1978) qui, après avoir été identifié génétiquement, a pu être localisé sur le chromosome I (Xu et al. 1993a).

VIII– Carte de liaison génétique et séquence du génome nucléaire d'*A. bisporus*

Le développement de marqueurs moléculaires et la construction d'une carte de liaison génétique de ces marqueurs sont des outils essentiels pour les études génétiques. Chez *A. bisporus*, plusieurs tentatives de construction d'une carte de liaison génétique ont été rapportées par Kerrigan et al. (1993b), Callac et al. 1997, Moquet et al. 1999 et Foulongne-Oriol et al. (2010). A l'heure actuelle, la carte construite par Foulongne-Oriol et al. (2010) constitue la carte de liaison génétique la plus complète du génome d'*A. bisporus*. L'analyse de liaison a été réalisée sur une descendance (118 homocaryons) issue du croisement entre deux souches de parenté éloignée, et appartenant à deux variétés différentes : var. *bisporus* × var. *burnettii* (Callac et al. 1993). Cette carte comprend 324 marqueurs répartis dans 13 groupes de liaison et couvre une distance génétique totale de 1156 cM (Fig. 3).

La séquence complète et annotée du génome d'*A. bisporus* a été récemment publiée (Morin et al. 2012). Les génomes de deux souches homocaryotiques H97 (var. *bisporus*) et

JB137S8 (var. *burnettii*), leur répertoire de gènes et leurs profils de transcription sur différents milieux ont été comparés.

Les séquences de 82 marqueurs génétiques appartenant aux 13 groupes de liaison (chromosomes) d'*A. bisporus* établis par Foulongne-Oriol et al. en 2010 ont permis la localisation et l'orientation des 19 plus longs « scaffolds » issus du séquençage sur les 13 chromosomes d'*A. bisporus*. Le génome de la souche H97 a une taille de 30 387 844 paires de bases. Le rapport longueur physique sur distance génétique a une valeur moyenne de 33 kpb/cM (Morin et al. 2012).

Des milliers d'éléments transposables répétés (transposons de classe I et II) appartenant à 216 familles différentes occupent 11,2 % du génome. Ces éléments transposables ne sont pas uniformément répartis dans le génome, mais sont généralement regroupés dans les régions télomériques et centromériques des chromosomes. Plusieurs de ces éléments transposables avaient au préalable été décrits et montrés capables de se déplacer à différents loci du génome (Sonnenberg et al. 1999), fournissant ainsi une possible explication à l'apparition d'anomalies phénotypiques telles que des secteurs ou stroma se développant à partir de cultures mycéliennes stables et d'apparence normale (Horgen et al. 1996).

10 438 et 11 289 gènes putatifs codant pour des protéines ont été détectées dans les génomes des souches H97 et JB137-S8, respectivement.

Parmi ces gènes, le génome d'*A. bisporus* code pour un répertoire complet d'enzymes de dégradation de polysaccharides analogue à celui d'autres champignons dégradateurs de bois. L'analyse comparative des transcriptomes du mycélium d'*A. bisporus* cultivé sur un milieu défini (gélose), dans de la terre de gobetage ou dans du compost a montré que des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation du xylane, de la cellulose, de la pectine, et de protéines sont fortement surexprimés dans le compost. La surexpression de ces gènes ainsi que ceux encodant une manganese peroxydase lignolytique, plusieurs oxydases à radicaux cuivre, et

des cytochromes P450, est compatible avec les défis posés par la croissance dans des milieux complexes riches en substances humiques. De plus, un motif commun a pu être identifié dans les promoteurs des gènes d'*A. bisporus* fortement exprimés dans les substrats riches en substances humiques. Ces observations mettent en évidence la présence de mécanismes génétiques et enzymatiques spécifiques gouvernant l'adaptation de cette espèce à une niche écologique riche en substances humiques formées lors de la dégradation de la matière végétale. Cela permet de montrer le rôle primordial joué par certains champignons comme *A. bisporus*, dans la structure de certains sols forestiers et la séquestration du carbone dans les écosystèmes terrestres (Morin et al. 2012).

IX- Le génome mitochondrial d'*A. bisporus*

La mitochondrie est un organe clé des cellules eucaryotes. Via la phosphorylation oxydative, elle représente le plus important site de formation de l'ATP, principale source d'énergie des cellules (Gray et al. 1999). A côté de ce rôle bien connu, les mitochondries sont impliquées dans un grand nombre de processus cellulaires comme la bêta-oxydation des acides gras, le vieillissement cellulaire et l'apoptose (Basse, 2010).

Chez les champignons supérieurs, en particulier chez les espèces somatogames où la plasmogamie fait intervenir la fusion de cellules banales du thalle, l'hérédité mitochondriale varie selon les espèces bien que majoritairement uniparentale dans la plupart des cas (Birky, 2001; Xu, 2005). Elle peut varier avec les combinaisons d'isolats impliqués dans les croisements (en particulier la contribution relative du cytoplasme de chaque parent). Cette transmission majoritairement uniparentale (donc potentiellement clonale) a fait de l'ADN mitochondrial (ADNmt) un marqueur de choix pour les études de distribution et d'évolution des populations fongiques (Avisé, 1994).

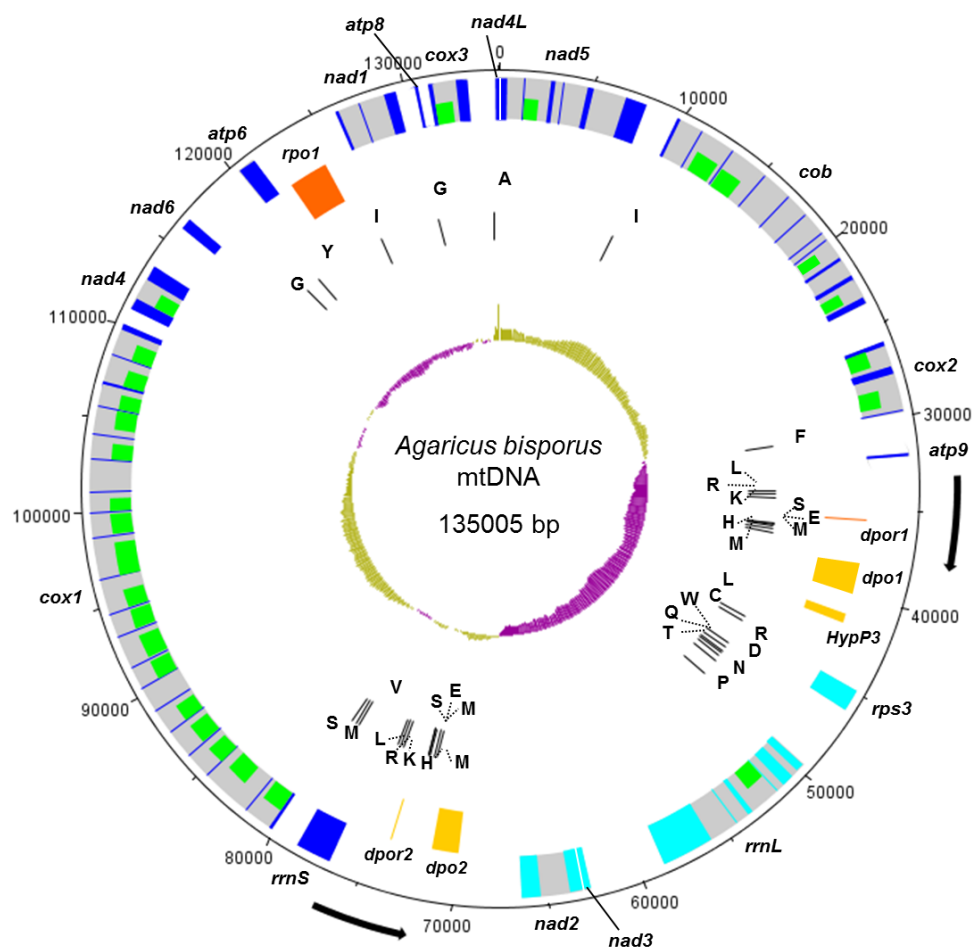


Figure 4- Carte physique circulaire du génome mitochondrial d'*A. bisporus* var. *bisporus* souche H97. La nt 1 a été arbitrairement défini comme étant le premier nt du codon d'initiation (AUG) du gène *nad5*. Le premier cercle (extérieur) représente les gènes *A. bisporus* codant pour des protéines mitochondriales et les deux ARNr (*rrnL* et *rrnS*). Le nom de chaque gène est indiqué dans sa région centrale. Pour chaque gène, les introns sont représentés par des boîtes grises avec les *hegs* introniques qu'ils contiennent en vert. Les exons sont en bleu foncé et en bleu pâle lorsque les CDS sont identifiés dans le sens des aiguilles d'une montre et dans le sens contraire, respectivement. Le deuxième cercle (en partant de l'extérieur) représente les séquences d'origine plasmidique en orange. Le troisième cercle représente les ARNt désignés par le code à une lettre correspondant à l'acide aminé porté. Le cercle interne montre le biais du % en bases GC (« GC skew ») exprimé comme l'écart à la moyenne du % GC de l'ensemble du génome. Les grandes séquences répétées inversées (IR) sont indiquées par des flèches noires à l'extérieur des cercles (d'après Férandon et al. 2013)

En parallèle au séquençage du génome nucléaire, l'ADNmt de la souche homocaryotique H97 d'*A. bisporus* a été séquençé et annoté (Ferandon et al. 2013). Par sa taille de 135005 nt, ce génome mitochondrial représente l'un des plus grands génomes mitochondriaux fongiques connus. Cette taille est principalement due à l'accumulation d'éléments génétiques mobiles, comme les grands introns de groupe I (au nombre de 43), trois introns de groupe II et cinq fragments d'ADN montrant une similarité de séquence avec des plasmides linéaires mitochondriaux (Fig. 4). Les 46 introns du génome mitochondrial d'*A. bisporus* sont répartis dans huit des 15 gènes codant pour des protéines mitochondriales classiquement retrouvés chez les génomes mitochondriaux fongiques. De façon remarquable, l'ensemble des séquences introniques d'*A. bisporus* (61092 nt au total soit 45,3% du génome mitochondrial) inclut des représentants de la plupart des introns mitochondriaux de groupe I décrits dans le règne fongique. Le génome mitochondrial d'*A. bisporus* constitue ainsi, le plus grand réservoir d'introns mitochondriaux décrit à ce jour.

Les séquences ayant pour origine l'intégration de plasmides linéaires représentent 6730 nt au total soit 5,0% de l'ADNmt. Ces séquences possèdent des homologies importantes avec deux plasmides mitochondriaux différents décrits à l'état auto-répliatif ou intégrés à l'ADNmt d'autres champignons basidiomycètes: le plasmide pEM qui se réplique de façon autonome dans la mitochondrie de certaines souches de l'espèce proche *Agaricus bitorquis* (Robison et Horgen, 1996) et des séquences intégrées dans l'ADNmt d'*Agrocybe aegerita* (Bois et al. 1999; Barroso et al. 2001) ou *Moniliophthora perniciosa* (Formighieri et al. 2008). De plus, chez *A. bisporus* les séquences d'origine plasmidique sont situées dans ou à proximité de deux grandes (4559 nt) séquences répétées inversées (Fig. 5) contenant également deux clusters de gènes d'ARNt (Ferandon et al. 2013).

Chez *A. bisporus* var. *bisporus*, l'hérédité mitochondriale paraît principalement uniparentale et les conditions de culture semblent influencer l'haplotype mitochondrial de

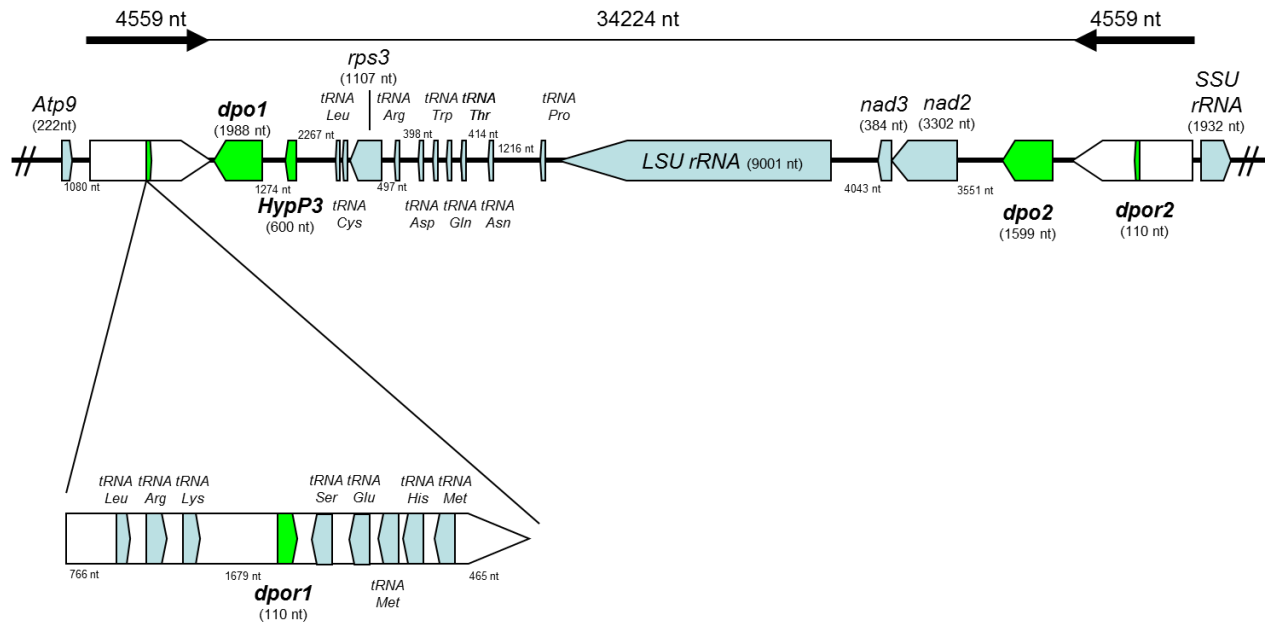


Figure 5- Représentation schématique de la région du génome mitochondrial d’*A. bisporus* var. *bisporus* souche H97 portant deux grandes séquences répétées inversées (IR). Les tailles et positions des unités répétées inversées et de la région en copie unique entre les IR sont indiquées au-dessus de la figure. Les gènes présents dans la région en copie unique et dans chaque IR sont représentés par des flèches avec leur nom et taille (en nt). Les flèches indiquent le brin codant de ces gènes. Les gènes mitochondriaux et des gènes d’origine plasmidique sont en gris et noir, respectivement. Les tailles des séquences intergéniques supérieures à 300 nt sont indiquées sur la figure (d’après Férandon et al. 2013)

l'hétérocaryon, que ce dernier soit issu d'un croisement entre deux homocaryons (Hintz et al, 1988; Jin et Horgen, 1993; Jin et Horgen, 1994), ou résulte de la fusion de deux protoplastes (De la Bastide et al. 1997; Khush et al. 1995).

Dans les populations sauvages d'*A. bisporus*, il a été montré un niveau élevé de variabilité génétique au niveau du génome mitochondrial. En effet, 140 haplotypes mitochondriaux ont été identifiés dans quatre populations naturelles provenant d'Europe ou d'Amérique du Nord (Xu et al. 1997, 1998). Ces études suggèraient que des événements de recombinaison impliquant l'ADNmt d'*A. bisporus* pouvaient se produire dans la nature.

Une preuve de l'existence d'événements de recombinaison dans le génome mitochondrial d'*A. bisporus* a été apportée par De la Bastide et al. (2003) lors d'une étude de croisements réalisés entre homocaryons compatibles, en conditions de laboratoire. L'analyse des croisements a montré qu'une hérédité uniparentale (transmission d'un seul haplotype mitochondrial à l'hétérocaryon formé) était la situation rencontrée dans la majorité des cas. Cependant, il était possible, selon les conditions de culture et les homocaryons impliqués dans le croisement, d'obtenir des combinaisons différentes des génomes mitochondriaux et nucléaires et même fréquemment des génomes mitochondriaux recombinants.

Récemment, Xu et al. (2013) ont étudié le potentiel de recombinaison mitochondriale dans quatre populations naturelles génétiquement distinctes d'*A. bisporus*: une population de l'Alberta (Canada); une population côtière de Californie; une population du désert de Sonoran en Californie et une population bretonne (France). L'analyse a permis d'identifier des signatures de recombinaison dans trois de ces quatre populations géographiques. Ce résultat contraste avec l'hérédité uniparentale des mitochondries préalablement décrites chez *A. bisporus* (Jin et al, 1992; Jin et Horgen, 1994).

A l'exception de la population du désert californien (Sonoran) qui appartient à la variété hétérothallique *burnetii*, la plupart des souches des trois autres populations (homothalliques

secondaires) produisent majoritairement des spores hétérocaryotiques et donc auto-fertiles qui ne nécessitent pas de croisement pour fructifier et assurer leur reproduction sexuée. Par conséquent, chez ces trois populations, une structure clonale est attendue au niveau mitochondrial. Cependant, en raison de l'existence d'une minorité de spores haploïdes homocaryotiques et donc auto-stériles, il y a aussi des possibilités de croisements à l'intérieur de ces trois populations. Plus le nombre de ces spores auto-stériles sera élevé, plus le nombre de croisements et donc de possibilités d'évènements de recombinaison mitochondriale sera grand.

X- Structure génétique des populations sauvages d'*A. bisporus*

Contrastant avec le grand nombre de connaissances disponibles sur les modes de reproduction d'*A. bisporus* établies en conditions de laboratoire, peu de données sont disponibles sur son cycle biologique et ses modes de reproduction dans ses milieux naturels. En Europe, *A. bisporus* a été récolté sous des cyprès (*Cupressus macrocarpa*), sur du fumier ou du compost de divers débris végétaux et divers déchets agricoles et horticoles (Callac 1994; Kerrigan 1995b). En Californie, l'habitat caractéristique d'*A. bisporus* est la litière des Cyprès de Monterey. De même, dans certaines régions du Canada, l'espèce a été retrouvée sur des sites horticoles ou agricoles (Kerrigan et al. 1995a).

Les souches cultivées industriellement (cultivars) forment un groupe relativement homogène d'un point de vue génétique, ce qui suggère qu'elles proviendraient d'une population unique avec un même ensemble de gènes (Kerrigan, 1990). Les données historiques indiquent que la plupart ou toutes les lignées de cultivars ont été sélectionnées au cours des trois derniers siècles à partir de champignons sauvages recueillis en Europe (Kerrigan et al. 1993a). En conséquence, la distinction entre souches sauvages et cultivées d'*A. bisporus* n'est pas facile en Europe, qui est une région d'origine et de culture importante de ce champignon (Callac, 1994).

La culture à grande échelle de *A. bisporus* soulève des préoccupations quant à la possibilité de modifications des populations sauvages naturelles par l'introduction de génotypes provenant de souches sélectionnées et cultivées industriellement. En effet, pour de nombreuses plantes de grande culture, les échanges mondiaux de semences et la création d'hybrides entre plantes cultivées et sauvages ont entraîné des modifications significatives de la structure génétique des populations sauvages des espèces concernées (Arriola et Ellstrand, 1996).

Dans le cas d'*A. bisporus*, l'analyse, à l'aide de marqueurs moléculaires, d'isolats sauvages a permis de montrer qu'en Amérique du Nord, les cultivars ont été « naturalisés », c'est à dire se sont introduits et acclimatés dans les milieux naturels (Kerrigan et Ross, 1989). En parallèle, ces auteurs ont également montré qu'il existait en Californie une population indigène, de type « non-cultivar » d'*A. bisporus*. En effet, des isolats sauvages d'*A. bisporus* récoltés en Californie possèdent un ou plusieurs marqueurs allozymes non retrouvés dans les importantes collections de cultivar (Kerrigan et Ross, 1989). De même, les fréquences des allèles présents dans le groupe des cultivars et dans celui des isolats sauvages sont très différentes, même dans des échantillons relativement petits de ces deux groupes (Kerrigan, 1990).

En 1993, Kerrigan et al. (1993a) ont utilisé 21 marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et allozymes pour caractériser un groupe de 29 hétérocaryons d'*A. bisporus* récoltés en Californie, et les comparer avec un ensemble de cultivars. Il a ainsi été montré que la population californienne d'*A. bisporus* avait une structure hétérogène, contenant deux éléments majeurs ancestraux, un apparemment introduit (type européen) et un autre apparemment autochtone (type non européen). Ces deux groupes co-existent en Californie sans s'être croisés d'une façon importante. De plus, il a été montré, au cours de cette étude, l'existence d'une hétérogénéité dans la distribution spatiale des génotypes: les éléments introduits étaient largement distribués sur le territoire géographique alors que les éléments autochtones occupaient une aire géographique restreinte.

En 1995, les génotypes nucléaires et les haplotypes mitochondriaux de 53 isolats disponibles d'*A. bisporus* récoltés dans le sud du Canada et dans le nord-ouest des États-Unis, ont été caractérisés (Kerrigan et al. 1995a) afin d'établir les similitudes génotypiques existant au sein et entre les isolats des différentes régions et de les comparer avec d'autres populations de la côte, du désert ou de l'intérieur de la Californie, d'Europe, d'Israël et également aux cultivars. Les résultats ont montré que tous les isolats de l'Ontario, de la Colombie-Britannique, de l'état de Washington et de l'Idaho possédaient une origine européenne, alors que presque tous les isolats de l'Alberta avaient une origine indigène. Cependant, il a été montré que du matériel génétique d'origine européenne avait pénétré l'Alberta et s'était établi dans l'habitat de la population indigène (Kerrigan et al. 1995a).

Dans une étude visant à évaluer la structure de la population d'*A. bisporus* de la région côtière de la Californie, les génotypes nucléaires et mitochondriaux ont été caractérisés chez 123 isolats. Comme précédemment, deux éléments majeurs sont apparus dans les échantillons analysés: l'un d'origine indigène et l'autre d'origine européenne. D'après les haplotypes mitochondriaux, une majorité (54%) des 121 isolats étaient d'origine européenne. Des isolats représentant des hybrides entre les deux groupes ancestraux ont également été mis en évidence. Ce fort taux d'occupation de l'habitat naturel par du matériel génétique étranger, l'incapacité apparente des souches indigènes à occuper complètement leur habitat et les grands réservoirs d'inoculum étranger représentés par les activités agronomiques suggèrent que la population indigène est soumise à une forte compétition et donc exposée à un risque sérieux de contraction, de dilution irréversible (en particulier par croisement génétique) et peut-être même d'extinction (Kerrigan et al. 1998).

Une autre étude de la structure génétique des populations naturelles d'*A. bisporus* a été menée par l'analyse de 342 isolats incluant des souches apparentés aux cultivars (« cultivar-like ») et des isolats indigènes provenant de 12 zones géographiques différentes (Xu et al. 1997).

Un des buts de l'étude était de déterminer les conséquences potentielles de la culture sur la structure génétique des populations d'*A. bisporus*. L'utilisation de dix loci nucléaires (marqueurs RFLP) a montré une grande diversité génétique dans toutes les populations d'origines géographiques différentes. Cependant, dans toutes les populations, les isolats « cultivar-like » ont montré une moins grande diversité génétique que les isolats indigènes. Les isolats « cultivar-like » provenant de régions géographiques différentes possédaient des distances génétiques plus faibles que des isolats indigènes pourtant collectés dans la même région. Ainsi, la large distribution des isolats de type « cultivar-like » paraît liée à une récente évocation de génotypes provenant de cultures industrielles, suivie par leur implantation dans le milieu naturel.

XI- Croisements et modes de vie pseudohomothallique dans la nature

Le mode de reproduction amphithallique prévoit que les croisements génétiques existent chez *A. bisporus*. Comme indiqué précédemment, certaines basides portent trois ou quatre basidiospores, dont la plupart ne possèdent qu'un seul noyau postméiotique. Une telle basidiospore avec un seul type nucléaire donne naissance à un mycélium homocaryotique auto-stérile. Le croisement entre deux homocaryons possédant des allèles d'incompatibilité (« mating-type ») compatibles, conduit à la formation d'un hétérocaryon fertile (Xu et al. 1993a).

La première preuve de l'existence d'un croisement dans une population naturelle d'*A. bisporus* a été apportée par Xu et al. en 2002. En effet, ce dernier a étudié la structure de populations d'*A. bisporus* collectées sur deux sites géographiques français (Gradignan et Dinard) sur une période de deux années. Un site était constitué par du fumier de cheval et soumis à de fréquentes perturbations par des activités humaines de type agricole ou industriel. L'autre site était constitué par la litière d'une forêt de cyprès et en apparence dépourvu de toute perturbation d'origine humaine. L'utilisation de marqueurs génétiques a permis d'étudier finement la structure

génétique des populations au sein et entre ces deux sites géographiquement éloignés. Les résultats ont montré un haut degré de diversité génétique au sein de chacune des populations. Au contraire, peu d'évidences en faveur de l'existence de clones végétatifs d'*A. bisporus* ont été trouvées. En accord, il n'y avait que peu d'évidences en faveur de l'existence d'un mode de reproduction pseudohomothallique ou de consanguinité dans la population d'*A. bisporus* étudiée, malgré le nombre élevé de basides bisporées observées sur les isolats de cette espèce. Ces résultats contrastent ainsi avec ceux obtenus chez de nombreuses autres espèces de basidiomycètes, comme par exemple *Armillaria bulbosa* où un seul clone peut occuper plusieurs hectares de forêt (Smith et al. 1992).

Suite à la découverte de ces preuves de croisements dans les populations naturelles (Xu et al. 2002), une autre étude a été réalisée en conditions semi-contrôlées afin d'évaluer le rôle relatif des croisements dans les événements susceptibles d'aboutir à une fructification chez *A. bisporus*, i. e. des croisements entre deux homocaryons provenant de deux parents différents ou d'un seul parent hétérocaryotique, des croisements entre un homocaryon et un hétérocaryon via le phénomène de Buller, issus d'un même parent hétérocaryotique ou de deux parents génétiquement différents (Callac et al. 2006). Pour cela, un mycélium homocaryotique a été inoculé avec les spores d'un second parent et cultivé dans du compost. Le résultat de cette étude a montré que les spores inoculées sont incapables de germer en l'absence de mycélium dans le substrat. Le phénomène de Buller (croisement entre homocaryon et hétérocaryon) est apparu comme un important processus de croisement (Callac et al. 2006). Bien que ces résultats apportent une explication aux conclusions tirées par Xu et al. (2002) de l'étude des populations sauvages françaises, ils représentent cependant une situation particulière qui probablement ne se produit pas souvent dans la nature. En effet, la plupart des mycélia d'*A. bisporus* var. *bisporus* présents dans la nature sont de type hétérocaryotiques.

XII- Présentation des travaux réalisés au cours de cette thèse

Mes travaux de thèse s'inscrivent donc dans le cadre général de la compréhension des modalités d'évolution intraspécifique d'*A. bisporus*. Ils s'articulent autour de deux axes de recherche principaux:

Le premier est une étude des modalités d'évolution moléculaire intraspécifique des génomes nucléaires et mitochondriaux des souches sauvages d'*A. bisporus*.

Le deuxième axe porte sur les mécanismes biologiques responsables de l'évolution des souches sauvages dans la nature (modes de reproduction et de dissémination actifs utilisés).

Pour cela, dans un premier temps, des souches d'intérêt pour l'ensemble de l'étude ont été sélectionnées au sein des isolats d'*A. bisporus* provenant de populations sauvages françaises disponibles au laboratoire (chapitre 1).

L'évolution moléculaire intraspécifique des génomes nucléaires et mitochondriaux de ces souches sauvages est abordée dans le chapitre 2. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans la revue « Current genetics », en 2014.

Cette étude a permis le développement de marqueurs moléculaires performants utilisables pour suivre le comportement biologique de souches d'*A. bisporus* dans leur milieu naturel. Le chapitre 3 décrit la caractérisation de ces marqueurs moléculaires en vue de l'implantation et du suivi du comportement de souches sauvages dans un système simplifié (en chambre de culture) ainsi que dans une parcelle expérimentale de cypress.

En effet, une simulation des événements de croisement entre souches sauvages a été réalisée, en conditions semi-contrôlées dans une chambre de culture. Pour cela, des expériences de croisements entre des basidiospores émises par des sporocarpes et des mycelia de souches sauvages implantés dans du compost, ont été réalisées, pour simuler l'implantation d'une

population naturelle. Les résultats obtenus sont regroupés dans le chapitre 4 sous la forme d'une publication en cours de soumission.

L'étude de la propagation et de l'évolution spatio-temporelle des souches sauvages d'*A. bisporus* dans leur milieu naturel (deux parcelles expérimentales de cyprès) est présentée dans le chapitre 5.

Chapitre 1: Sélection des souches d'*Agaricus bisporus* de l'étude

Nos travaux sur la compréhension de la diversité génétique des populations d'*A. bisporus* s'articulent autour de deux axes de recherche: (1) l'étude des modalités d'évolution moléculaire des génomes mitochondriaux et nucléaires des souches sauvages d'*A. bisporus*, abordée au niveau intraspécifique, (2) la compréhension des mécanismes biologiques moteurs de cette évolution dans le milieu naturel, en suivant le comportement biologique (envahissement du milieu et modes de reproduction) de souches colonisant un site nouveau.

Pour atteindre ces objectifs, il était nécessaire de sélectionner, au préalable, dans l'importante collection de souches sauvages disponibles au laboratoire, un ensemble de souches à la fois représentatives de la biodiversité génétique de l'espèce (tant au niveau nucléaire que mitochondrial) et aussi susceptibles d'être implantées puis suivies (à l'aide de marqueurs moléculaires) après implantation dans une parcelle expérimentale ou lors d'expériences de simulation d'implantation réalisées en chambres de culture.

La sélection de ces souches fait l'objet de ce chapitre.

Les souches de l'étude devant être, à terme, introduites dans une parcelle expérimentale localisée dans le Lot-et-Garonne (Dept 47), sur la commune de Bourran, nous avons décidé, afin de limiter les risques d'invasion du milieu naturel, d'utiliser comme point de départ des souches sauvages françaises.

La Geroplasme CGAB de l'UR1264 MycSa INRA comprend environ 400 souches sauvages d'*A. bisporus*, collectées dans un grand nombre de pays. La collection comprend en particulier 157 souches françaises qui ont été recueillies à partir de trois régions géographiques: Saint-Malo, Lorient et La Rochelle sous cyprès. En ce qui concerne la population de La Rochelle, peu de données phénotypiques et génotypiques étaient disponibles; en conséquence, les souches de cette région ont été éliminées de notre étude.

Les 104 souches restantes provenaient des deux populations géographiques: Lorient et Saint-Malo, séparées de 140 km et situés, respectivement, sur les côtes sud et nord de la Bretagne



Figure 1-1- Localisation géographique des régions de Saint-Malo (Dept. 35) et Lorient (Dept. 56) en région Bretagne (France)

(Fig. 1-1). Les données relatives à ces deux populations dont la structure génétique avait fait l'objet de plusieurs études (Xu et al. 1997, 1998) ont été compilées. Ces données concernaient des indications phénotypiques comme la vitesse de croissance, le nombre de spores par baside, ou la couleur du sporocarpe, et aussi des marqueurs moléculaires comme des marqueurs de type microsatellites nucléaires ou des haplotypes mitochondriaux caractérisés par RFLP.

La sélection d'un ensemble des souches françaises à retenir comme objet d'étude est basée sur différents critères:

1– l'ensemble devait contenir des souches représentatives des deux populations isolées géographiquement présentes dans la compilation de départ (Lorient et Saint-Malo).

2– Ces souches devaient être principalement bi-sporées avec cependant un petit nombre de basides tri- ou tétra-sporées, conduisant à un mode de reproduction amphithallique majoritairement pseudohomothallique.

3- Les souches retenues devaient montrer une bonne vigueur (exprimée en termes de vitesse de croissance mycélienne et aussi de rendement de fructification).

4- Les souches retenues devaient présenter des génotypes nucléaires et des haplotypes mitochondriaux différents.

Il est à noter que, pour chaque souche de la compilation, l'absence de donnée sur l'un de nos critères de choix a conduit à l'exclusion de cette souche de l'étude.

Ainsi, 24 souches dépourvues de données phénotypiques sur le nombre moyen de spores par baside (BSN), le rendement de fructification et la vitesse de croissance du mycélium ont été exclues de l'étude.

Pour 51 des 80 souches restantes, (29 de St-Malo et 22 de Lorient), des données moléculaires basées sur six marqueurs nucléaires de type microsatellite (SSR9, SPTK13, SSR42, SSR55, SSR64, et SSR65) établies par Foulongne-Oriol et al. (2009) étaient disponibles (Tableau 1-1). Un arbre de distance basé sur ces six marqueurs SSR a été construit (en utilisant la méthode

Tableau 1-1- Données moléculaires basées sur six marqueurs nucléaires de type microsatellite (SSR9, SPTK13, SSR42, SSR55, SSR64, et SSR65) pour 49 souches étudiées, établies par Foulongne-Oriol et al. (2009)

souche	Marqueurs SSR					
	SSR9	SPTK13	SSR42	SSR64	SSR65	SSR55
Bs 171	154/154	229/229	159/178	107/107	199/213	203/204
Bs 172	154/154	229/229	159/178	107/107	199/213	203/204
Bs 175	157/157	212/212	159/188	107/107	199/213	199/204
Bs 177	154/154	212/212	184/184	107/107	190/195	201/203
Bs 183	157/157	212/221	159/159	107/107	199/204	199/199
Bs 187	154/157	212/212	159/184	107/107	199/203	201/202
Bs 188	154/157	212/212	159/184	107/107	199/203	201/202
Bs 194	154/154	212/212	178/180	107/107	202/213	201/201
Bs 199	154/157	212/212	180/184	107/107	204/213	204/206
Bs 204	157/157	212/212	159/159	113/113	199/199	201/201
Bs 205	157/157	212/221	159/159	107/107	190/199	199/199
Bs 207	157/157	212/212	159/178	107/110	190/198	200/202
Bs 222	154/157	212/212	159/184	107/107	199/203	202/202
Bs 226	154/157	212/212	159/178	107/107	190/204	199/202
Bs 363	154/157	212/212	159/180	107/107	190/195	199/206
Bs 228	154/157	221/232	159/159	107/110	199/202	200/201
Bs 230	154/157	212/221	159/192	107/107	199/213	199/201
Bs 232	154/157	212/212	159/184	107/107	199/203	200/202
Bs 234	154/157	212/212	159/180	107/107	190/199	202/202
Bs 237	154/157	212/212	159/180	107/107	190/199	202/202
Bs 238	154/157	212/212	159/180	107/107	190/199	202/202
Bs 240	157/157	212/212	159/192	107/110	198/203	199/199
Bs 243	154/157	212/212	176/188	107/107	203/203	199/199
Bs 244	154/154	212/212	159/188	107/107	190/205	201/202
Bs 245	154/154	212/212	178/180	107/113	201/208	203/206
Bs 247	154/154	212/229	178/180	107/107	199/204	202/203
Bs 249	154/157	212/212	180/184	107/107	204/213	206/206
Bs 251	154/154	212/212	159/188	107/107	190/205	201/202
Bs 252	157/157	212/212	176/178	107/107	190/208	199/201
Bs 253	154/154	212/212	159/184	107/107	190/195	201/203
Bs 254	154/157	212/212	159/159	107/110	202/213	199/199
Bs 256	154/154	212/212	159/188	107/107	190/205	202/202
Bs 258	154/154	212/212	159/178	107/107	199/199	199/201
Bs 260	154/154	229/229	159/178	107/107	199/213	201/204
Bs 261	154/157	212/212	159/184	107/107	206/213	199/202
Bs 262	154/154	212/212	178/180	107/107	201/207	203/206

Bs 263	157/157	229/229	178/180	107/107	190/202	199/203
Bs 264	157/157	212/212	159/159	107/107	190/199	199/199
Bs 267	154/154	212/212	178/180	107/107	201/207	203/206
Bs 269	154/154	212/212	178/180	107/107	201/207	203/206
Bs 270	154/154	229/229	159/178	107/107	199/213	202/202
Bs 271	157/157	212/212	159/188	107/107	190/205	201/202
Bs 275	154/154	212/212	159/184	107/107	190/195	201/203
Bs 276	154/154	212/212	159/184	107/107	190/195	201/203
Bs 357	157/157	212/212	159/188	107/107	199/213	199/204
Bs 358	154/154	212/212	180/180	107/107	201/207	203/206
Bs 361	154/154	212/212	180/180	107/107	201/207	206/206
Bs 365	154/154	212/212	178/180	107/107	201/207	203/206
Bs 368	154/154	212/212	159/184	107/107	190/195	201/203
Bs 369	154/154	212/212	159/184	107/107	190/195	201/203
Bs 370	157/157	229/229	178/180	107/107	190/202	199/203

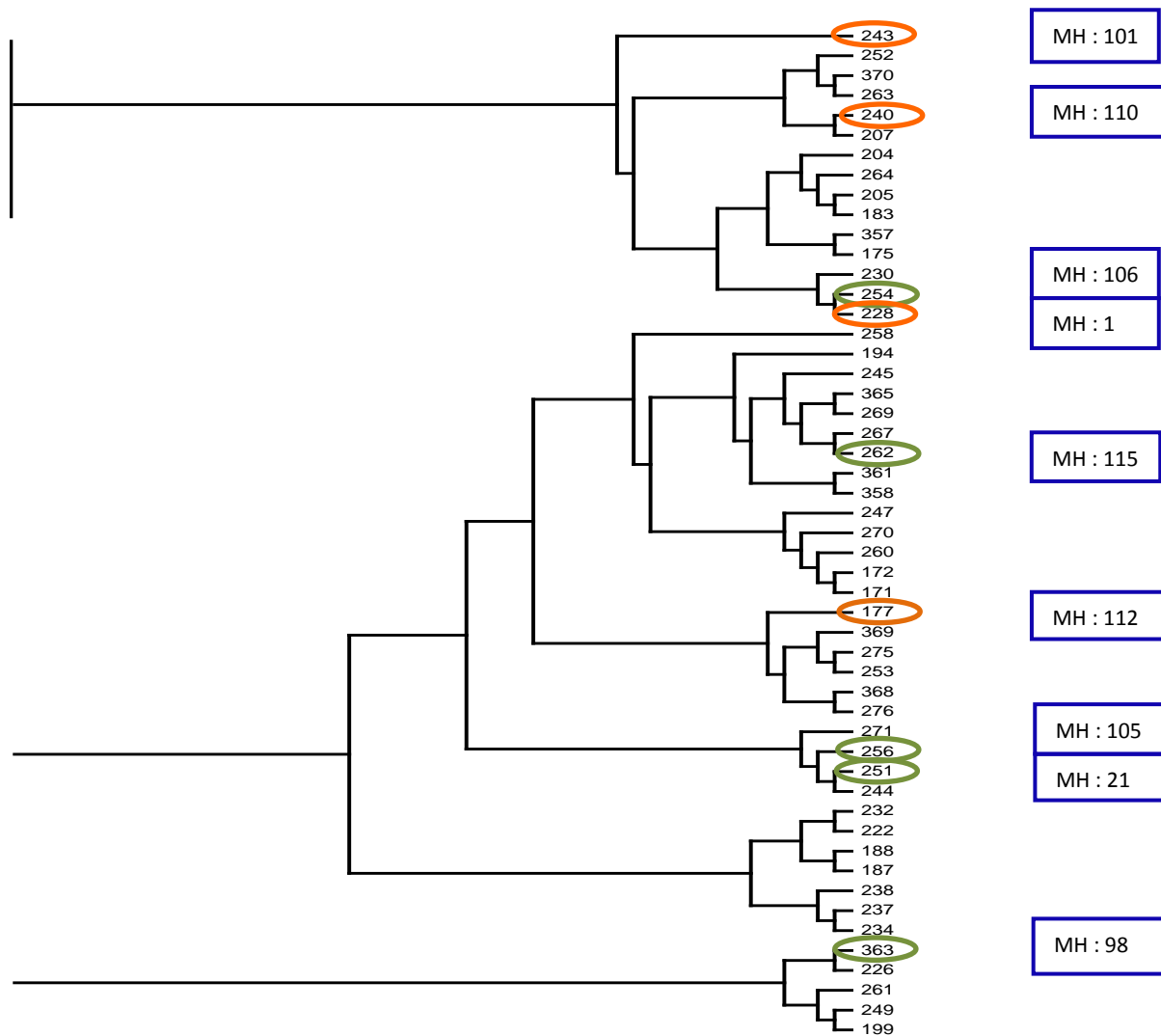


Figure 1-2- Arbre de Distance par la méthode du « neighbor-joining » réalisé sur 51 souches françaises d'*A. bisporus*. L'arbre est basé sur six marqueurs microsatellites décrits précédemment par Foulongne-Oriol et al. 2009. Chaque numéro XXX indique le nom BsXXX donné à la souche dans la collection CGAB (collection du Germoplasme des Agarics à Bordeaux, INRA, France). Les souches sélectionnées sur les sites de Lorient et de Saint-Malo sont encadrées en vert et en orange, respectivement. Leur haplotype mitochondrial (MH) est celui décrit par Xu et al. (1998).

du plus proche voisin « neighbor-joining method » à l'aide du logiciel PowerMarker V3.25 (Liu et Muse, 2005) (<http://www.powermarker.net>). Cet arbre (Fig. 1-2) permet d'obtenir une estimation des distances génétiques entre les noyaux des 51 souches.

Des données basées sur neuf marqueurs mitochondriaux de type RFLP (nommés BS1, BS2 (5), B4b, B5, B6, B7, B9, B13, B15) établis par Xu et al (1998) étaient disponibles pour 49 des 51 souches. Ces marqueurs RFLP ont permis de définir 15 haplotypes mitochondriaux différents dans les 49 souches étudiées. Huit de ces 15 haplotypes (mt84, mt99, mt101, mt104, mt105, mt106, mt109 et mt110) étaient trouvés dans une seule souche (Tableau 1-2). Les sept autres haplotypes étaient retrouvés dans plusieurs souches (dont le nombre variait de deux souches pour les haplotypes mt2 et mt98 jusqu'à 14 souches pour l'haplotype mt1).

Les données phénotypiques (nombre moyen de spores par baside, rendement de fructification et croissance mycélienne) ainsi que l'origine géographique de chaque souche caractérisée par son haplotype mitochondrial ont été rassemblées dans le tableau 1-2. La comparaison de ces données avec l'arbre de distance basé sur les marqueurs SSR nucléaires (Fig. 1-2) a permis de sélectionner neuf souches (quatre de St-Malo en orange sur le tableau et la figure et cinq de Lorient en vert) porteuses d'haplotypes mitochondriaux différents (quatre haplotypes rares : mt101, mt105, mt106 et mt110 et cinq haplotypes largement distribués dans les populations étudiées : mt1, mt21, mt98, mt112 et mt115). Ces souches possédaient toutes un BSN entre 2,17 et 2,51, en faveur d'un cycle amphithallique et donc, de la possibilité de croisements à partir des spores uni-nuclées produites par une minorité de basides tri ou tétra-sporées.

De plus, une attention particulière a été portée à la distribution de ces souches dans des clades éloignés de l'arbre de distance nucléaire, garante d'une diversité génétique importante de leur matériel génétique nucléaire.

Enfin, Toutes ces souches montraient une bonne croissance mycélienne *in vitro* (entre 23 et 56 mm de diamètre en 14 jours) et, à l'exception des souches Bs243 (haplotype mt101) et

Tableau 1-2- Données phénotypiques pour 49 souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* ; concernant le nombre moyen de spores par baside (BSN), le rendement de fructification (exprimé en kg de spoprophores (poids frais)/m² de surface de compost) et la vitesse de croissance des colonies mycéliennes (en mm après 14 jours) classées en fonction de leur haplotype mitochondrial.

a.

Haplotype mt	Souche	Origine	BSN	Rendement (kg/m ²)	Croissance (mm/14 jours)
1	Bs 275	St Malo	2.37	8.17	37-40
	Bs 261	St Malo	3.77	8.81	55-56
	Bs 263	St Malo	2.22	16.63	28-27
	Bs 264	St Malo	2.13	0.91	48-38
	Bs 270	St Malo	2.27	6.83	36-40
	Bs 357	St Malo	2.05	14.81	-
	Bs 370	St Malo	2.07	14.87	-
	Bs 172	Lorient	2.37	0.00	21-25
	Bs 175	Lorient	2.19	0.98	45-46
	Bs 194	Lorient	2.26	0.00	55-53
	Bs 205	Lorient	2.18	4.07	56-53
	Bs 228	Lorient	2.17	12.56	56-55
	Bs 234	Lorient	2.44	0.92	33-33
	Bs 238	Lorient	2.16	4.60	40-40

b.

Haplotype mt	Souche	Origine	BSN	Rendement (kg/m2)	Croissance (mm/14 jours)
2	Bs276	St Malo	2.11	10.63	29-32
	Bs258	St Malo	2.33	0.00	47-50

c.

Haplotype mt	Souche	Origine	BSN	Rendement (kg/m2)	Croissance (mm/14 jours)
21	Bs 271	St Malo	2.32	2.69	48-47
	Bs 251	St Malo	2.25	10	39-50
	Bs 244	St Malo	2.16	16.78	49-45

d.

Haplotype mt	Souche	Origine	BSN	Rendement (kg/m2)	Croissance (mm/14 jours)
98	Bs 358	St Malo	2.49	1.26	-
	Bs 363	St Malo	2.38	15.15	27- *

e.

Haplotype mt	Souche	Origine	BSN	Rendement (kg/m2)	Croissance (mm/14 jours)
112	Bs177	Lorient	2.51	13.41	23-30
	Bs 267	St Malo	2.44	1.61	28-30
	Bs 269	St Malo	2.43	0.71	22-22
	Bs 252	St Malo	2.09	5.80	40-41
	Bs 183	Lorient	2.01	0.00	52-*
	Bs 187	Lorient	2.07	0.00	34-45
	Bs 188	Lorient	2.23	0.00	40-40
	Bs 226	Lorient	2.18	15.63	55-55
	Bs 230	Lorient	2.06	6.61	40-40

f.

Haplotype mt	Souche	Origine	BSN	Rendement (kg/m2)	Croissance (mm/14 jours)
115	Bs 262	St Malo	2.44	11.03	27-31
	Bs 361	St Malo	2.38	1.70	-
	Bs 365	St Malo	2.29	0.04	-
	Bs 368	St Malo	2.46	11.70	-
	Bs 369	St Malo	2.44	7.82	-
	Bs 249	St Malo	2.18	0.00	33-27
	Bs 245	St Malo	2.96	0.00	36-31
	Bs 247	St Malo	2.21	5.08	46-39

g.	Haplotype mt	Souche	Origine	BSN	Rendement (kg/m2)	Croissance (mm/14 jours)
	119	Bs 199	Lorient	2.19	2.61	32-*
		Bs 207	Lorient	2.25	0.30	54-*
		Bs 232	Lorient	2.09	4.43	42-*
h.	Haplotype mt	Souche	Origine	BSN	Rendement (kg/m2)	Croissance (mm/14 jours)
	84	Bs253	St Mao	2.59	0.00	35-36
		99	Bs260	St Malo	2.13	4.15
	101		Bs243	Lorient	2.21	1.28
	104	Bs204	Lorient	-	2.30	25-*
		105	Bs256	St Malo	2.26	12.03
	106		Bs254	St Malo	2.26	18.22
		109	Bs222	Lorient	2.12	0.65
	110		Bs240	Lorient	2.36	5.63

Haplotype mt1 (a); Haplotype mt2 (b); Haplotype mt21 (c); Haplotype mt98 (d); Haplotype mt112 (e) ; haplotype mt115 (f); haplotype mt119 (g); ou un haplotype unique (rencontré dans une seule souche de l'étude) (h). Les souches retenues sont encadrées en vert (Lorient) et en orange (Saint-Malo). Les caractéristiques ayant conduit à l'exclusion d'une souche de notre sélection sont encadrées en jaune. Pour les souches sélectionnées, les valeurs de rendement encadrées en rose sont discutées dans le texte

Bs240 (haplotype mt110), des rendements de fructification également élevés (entre 10 et 18 Kg/m² de compost). En effet, il nous a paru intéressant d'inclure dans notre étude les souches Bs 243 et Bs240 qui, non seulement, portaient des haplotypes mitochondriaux uniques, se trouvaient sur des branches éloignées des autres souches dans l'arbre nucléaire et associaient de faibles rendements de fructification (1 à 5 Kg/m²) à une vitesse de croissance mycélienne *in vitro* élevée (>30 mm/14 J).

Finalement, les neuf souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* (Bs177, Bs228, Bs240 et Bs243 de Saint-Malo et Bs254, Bs256, Bs262 et Bs363 de Lorient) sélectionnées dans ce chapitre ont été utilisées pour étudier la variabilité intraspécifique au niveau nucléaire et mitochondrial (chapitre 2). Parmi ces souches, des marqueurs mitochondriaux et nucléaires ont été développés (chapitre 3).pour permettre la caractérisation de cinq d'entre elles, en préliminaire à leur implantation dans la parcelle expérimentale de cyprès (chapitre 5).

Chapitre 2: Evolution moléculaire intraspécifique des génomés nucléaires et mitochondriaux de souches sauvages d'*Agaricus bisporus*

Publication

**The intraspecific variability of mitochondrial genes of *Agaricus
bisporus* reveals an extensive group I intron mobility
combined with low nucleotide substitution rates**

Jalalzadeh B, Sare Carras I, Ferandon C, Callac P, Farsi M, Savoie JM, Barroso G

Current Genetics, 27 August 2014

The intraspecific variability of mitochondrial genes of *Agaricus bisporus* reveals an extensive group I intron mobility combined with low nucleotide substitution rates

Banafsheh Jalalzadeh · Idy Carras Saré ·
Cyril Férandon · Philippe Callac · Mohammad Farsi ·
Jean-Michel Savoie · Gérard Barroso

Received: 1 April 2014 / Revised: 12 August 2014 / Accepted: 18 August 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Intraspecific mitochondrial variability was studied in ten strains of *A. bisporus* var. *bisporus*, in a strain representative of *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* and in a strain of the closely related species *Agaricus devoniensis*. In *A. bisporus*, the *cox1* gene is the richest in group I introns harboring homing endonuclease genes (*heg*). This study led to identify group I introns as the main source of *cox1* gene polymorphism. Among the studied introns, two groups were distinguished according to the *heg* they contained. One group harbored *heg* maintained putatively functional. The other group was composed of eroded *heg*

sequences that appeared to evolve toward their elimination. Low nucleotide substitution rates were found in both types of intronic sequences. This feature was also shared by all types of studied mitochondrial sequences, not only intronic but also genic and intergenic ones, when compared with nuclear sequences. Hence, the intraspecific evolution of *A. bisporus* mitochondrial genome appears characterized by both an important mobility (presence/absence) of large group I introns and by low nt substitution rates. This stringent conservation of mitochondrial sequences, when compared with their nuclear counterparts, appears irrespective of their apparent functionality and contrasts to what is widely accepted in fungal sequence evolution. This strengthens the usefulness of mtDNA sequences to get clues on intraspecific evolution.

Communicated by S. Hohmann.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00294-014-0448-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

B. Jalalzadeh · C. Férandon · P. Callac · J.-M. Savoie ·
G. Barroso (✉)
INRA, UR1264 MycSA, CS20032, 33882 Villenave d'Ornon
Cedex, France
e-mail: gerard.barroso@u-bordeaux2.fr

B. Jalalzadeh
Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR),
Mashhad, Iran

I. C. Saré
Laboratoire de Biotechnologies des Champignons (LBC),
Département de Biologie Végétale, Faculté des Sciences et
Techniques, Université Cheikh Anta Diop (UCAD), Dakar,
Senegal

M. Farsi
Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

G. Barroso
Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saigat, 33076 Bordeaux
Cedex, France

Keywords Basidiomycota · *cox1* gene · *heg* · Mobile ORF · SNP (single-nucleotide polymorphism)

Introduction

In eukaryotes, introns are located in nuclear and organelle genes from several kingdoms. Large introns are frequent in mitochondrial genomes (mtDNA) of plants and of some fungal species such as the Ascomycota *Podospora anserina* (75 % of the overall size of mtDNA, Cummings et al. 1990) or the Basidiomycota *Agaricus bisporus* (45 % of the mtDNA size Ferandon et al. 2013). On the contrary, mitochondrial introns are scarce in Metazoa despite these organisms are grouped with fungi among Opisthokonts. This leads to a high and puzzling diversity in size and structural organization of mitochondrial genomes (Burger et al. 2003) that contrasts with the reported monophyletic origin of mitochondria, arising from an eubacterial symbiont

whose closest relatives are the α -proteobacteria (Gray et al. 1999; Gray 2014).

When comparing the relative amounts of coding and noncoding sequences, animals and plants mitochondrial genomes reveal divergent positions: the small and highly streamlined mtDNAs of animals have a size ranging from 14 to 20 kbp (Burger et al. 2003), whereas plant mtDNAs range in size from 180 to 2,000 kbp in the Cucurbitaceae plant family (Ward 1981) and even up to an enormous 3.9 megabase genome found in the flowering plant *Amborella trichopoda* and described as the result of horizontal gene transfer events involving at least four entire mitochondrial genomes (Rice et al. 2013). The genome-size expansions of plant mtDNAs are only weakly associated with gene content and are assumed to mainly reflect an abundance of large intronic and intergenic sequences (Burger et al. 2003).

In this context, fungi appear as an interesting eukaryotic lineage to understand the molecular evolution of mitochondrial genome architecture. Indeed, despite phylogenetically related to the animals, the largest fungal mitochondrial genomes described to date reach sizes near those observed in the smallest mtDNAs of Viridiplantae (Ferandon et al. 2013).

In the phylum Basidiomycota, a survey of the molecular organization of mitochondrial genomes reveals considerable size variations from 49,704 nt in *Schizophyllum commune* (Specht et al. 1992) to 235,849 nt in the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani* (Losada et al. 2014), despite all these genomes contain about the same number of structural genes. These large size variations appear mainly due to the amount of introns and intergenic sequences they carried: *S. commune* does not possess any intron when *R. solani* carries at least 22 large introns with homing endonuclease genes (*heg*) and *A. bisporus* up to 43 group I introns and three group II introns (representing more than 45 % of its whole mtDNA size of 135,005 nt, Ferandon et al. 2013). For comparison, in the Ascomycota division, the mtDNA of the filamentous *Podospora anserina* contains 31–33 group I introns and two or three group II introns, representing 75 % of the race s genome size (94,192 nt, Cummings et al. 1990).

Most of the reported studies on the molecular evolution of mitochondrial genomes of Basidiomycota have focused on the comparison of interspecific variations, and few are known about the mitochondrial genome variability at the intraspecific level.

Considering that the mtDNA of *A. bisporus*, by its total number of group I introns, belongs to the largest fungal reservoirs of mitochondrial introns, its intraspecific variability was investigated in a selection of ten wild-type strains representing the biodiversity of French *A. bisporus* populations. These strains were also compared with the recently sequenced homokaryotic strain H97 derived from

a cultivar of *A. bisporus* var. *bisporus* (Morin et al. 2012). A wild-type strain of *Agaricus devoniensis* was added to the analysis, as this later species was previously described as phylogenetically closely related to *A. bisporus* in *Agaricus* section *Bivelares* (Challen et al. 2003; Kerrigan et al. 2008).

For these strains, the molecular variability of nuclear and mitochondrial sequences was investigated, by (1) evaluating variations in their molecular organization (large length modifications due to structural reorganizational events) and (2) quantifying single-nucleotide polymorphisms (SNPs) resulting from nt substitution or single nt deletion/insertion (indel). For both nuclear and mitochondrial genomes, the molecular variability was estimated for, on one hand, protein-coding sequences (the nuclear *rpb2* and *frk* genes and the mitochondrial *atp6* gene) and, on the other hand, for sequences considered under neutral selection such as noncoding intergenic and also optional sequences including some group I introns. Indeed, for some group I introns, an evolution to elimination from the mtDNA and an accompanying erosion of the carried *heg* were reported (Ferandon et al. 2010). Moreover, self-splicing introns and related *heg* were recently defined by Gogarten and Hilario (2006) as parasitic genetic elements, able to be gained by horizontal transfer then fixed in populations, despite not providing a fitness advantage to the host species. However, it is to be noted that some other introns and/or *heg* would not represent such accessory elements and that, consequently, their presence in a mitochondrial gene could be subject to selective pressure.

The characterization of the 18 group I introns found in the *cox1* gene of *A. bisporus* has led to distinguish two major types of introns on the basis of their distribution among eukaryotic species (Ferandon et al. 2010): (1) 16 widely distributed ones found in species belonging to different phyla and even sometimes different kingdoms, and (2) two rare introns reported in a little number of species (for *iAbl6*) or even specifically recovered in *A. bisporus* (for *iAbl4*). Among these 18 introns, 15 possessed a *heg* encoding a putatively functional HE of the LAGLIDADG (10 introns) or GIY-YIG (5 introns) superfamily while three introns (the rare *iAbl6* and *iAbl4* and the widely distributed *iAbl11*) were shown to carry eroded *heg*. Puzzlingly, the erosion of the *heg* carried by *iAbl11* was found to result from its split by a second “invasive” *heg*. From this, we decided to study the molecular evolution at the intraspecific level of the rare (specific) *iAbl4* intron, of the *iAbl11* intron with the split *heg*, and of a widely distributed group I intron with a putative functional *heg*. Among this last kind of introns, *iAbl10* was chosen because of its proximity to *iAbl11*, in the central part of the *cox1* gene.

For all the studied strains, the molecular organization (presence/absence) and the sequences of these three group I introns were established.

The observed intraspecific polymorphism due to the presence/absence of the studied introns was found associated with low rates of nt variation between homologous intronic sequences, thus contrasting with what is generally accepted for fungal sequence evolution where mitochondrial genomes are reported to evolve faster than nuclear ones (Burger et al. 2003; Ghikas et al. 2010; Torriani et al. 2014).

This prompts us to determine and compare the intraspecific nt variation rates of various coding and noncoding sequences belonging to the mitochondrial and nuclear compartments.

Materials and methods

Selection of *Agaricus* sp. wild-type strains

All strains were issued from subcultures of mycelia isolated from sporophores collected in the wild. According to the *A. bisporus* var. *bisporus* biological cycle, these cultured mycelia were assumed to be dikaryotic mycelia, each strain carrying two types of parental haploid nuclei (Raper et al. 1972), and accordingly, two copies (alleles) of each nuclear sequence. According to the conflicting reports and debates on the uni- or biparental heredity of mitochondria in *A. bisporus* (De la Bastide and Horgen 2003), strains could also be putatively heteroplasmic, carrying two mitochondrial haplotypes. In any case, the mitochondrial genome is known to be present in high copy number, allowing the occurrence of mutations without lethal impact (Burger et al. 2003).

From 1997 to 2002, Xu et al. (1997, 1998, 2002) have studied the genetic structure of natural worldwide populations of *A. bisporus*. These studies included both nuclear and mitochondrial genomes from wild-type strains

collected during two successive years in two different geographical French sites (Saint-Malo and Lorient) separated by 140 km and located, respectively, in the North and the South coasts of Brittany (France).

In a first step, we have compiled mitochondrial markers reported by Xu et al. (1998) for the *A. bisporus* Saint-Malo and Lorient strains to establish their mitochondrial haplotype. Then, six nuclear single-sequence repeat (SSRs) markers (Foulongne-Oriol et al. 2010) were added to the analysis for 29 strains from Saint-Malo and 22 from Lorient. A distance matrix (data not shown) based on these six SSRs markers (SSR9, SPTK13, SSR42, SSR55, SSR64, and SSR65) was used to construct a distance tree by the neighbor-joining method (Supplementary Figure S1). Nine strains of *A. bisporus* var. *bisporus* (five from Saint-Malo and four from Lorient), which all possessed a different mitochondrial haplotype and were widely distributed in the distance tree, were selected to study the intraspecific molecular variability of the mitochondrial and nuclear sequences in the French populations. The origins and characteristics of the selected *Agaricus* wild-type strains used in this study are listed in Table 1.

The French *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* wild-type strain (BS423) was added to the study. It is a homothallic haploid strain, which, accordingly, contains only one type of haploid genome and one mitochondrial haplotype (Cal-lac et al. 2003).

The recently sequenced homokaryotic strain H97, derived from a cultivar of *A. bisporus* var. *bisporus* (Morin et al. 2012), was used for comparison with the wild-type strains.

The *A. devoniensis* wild-type strain CA40 was previously described by Challen et al. (2003) and used as a non-*A. bisporus* control.

All strains are conserved in CGAB (Collection du Germoplasme des Agarics à Bordeaux, INRA, Bordeaux,

Table 1 Name and origin of the *Agaricus* strains and species used in this study

Species	Strain	Nuclear status	Geographical origin
<i>A. bisporus</i>			
var. <i>bisporus</i>	Bs177	Heterokaryotic	Lorient (France)
	Bs228	Heterokaryotic	Lorient (France)
	Bs240	Heterokaryotic	Lorient (France)
	Bs243	Heterokaryotic	Lorient (France)
	Bs251	Heterokaryotic	Saint-Malo (France)
	Bs254	Heterokaryotic	Saint-Malo (France)
	Bs256	Heterokaryotic	Saint-Malo (France)
	Bs262	Heterokaryotic	Saint-Malo (France)
	Bs363	Heterokaryotic	Saint-Malo (France)
	H97	Homokaryotic	Europe (homokaryon of a commercial hybrid)
var. <i>eurotetrasporus</i>	Bs423	Homokaryotic	La Rochelle (France)
<i>A. devoniensis</i>	CA40	Heterokaryotic	Montalivet (France)

France). Mycelia were cultured on solid CYM medium (Raper et al. 1972) supplemented with 0.1 % of compost (phase II) extract.

Characterization of mitochondrial introns

Three introns, all located in the central region of the *A. bisporus cox1* gene, were chosen on the basis of different characteristics described in Ferandon et al. (2010).

The *iAbi10* intron (subgroup ID, 1,783 nt) is widely distributed in eukaryotic lineages (i.e., orthologous sequences are found in several species belonging to various divisions of the fungal kingdom and even in species of the Viridiplantae phylum). In *A. bisporus* strain H97, used for the genome sequencing of the species, this intron was shown to carry a *heg* encoding a putatively functional HE protein belonging to the LAGLIDADG superfamily with two catalytic domains. Such HE proteins were reported to be involved in the mobility (transfer and site-specific integration) of the intron (Chevalier and Stoddard 2001), arguing for a present mobility of the *iAbi10* genetic element.

The *iAbi11* intron (subgroup IB1, 2,230 nt) is also widely distributed in eukaryotes (in fungi but also in Viridiplantae and in *Monosiga brevicollis* a member of the Choanoflagellida order). Interestingly, in *A. bisporus* strain H97, the *heg* (encoding a HE of the LAGLIDADG superfamily with a single motif) carried by this intron was shown to be split by another *heg* (also encoding a HE of the LAGLIDADG superfamily with a single motif). This invading *heg*, disrupting the recipient one, was shown to possess significant sequence identity with a *heg* described in another mitochondrial gene (*cob*) of phylogenetically distant fungi of the Ascomycota division.

The rare *iAbi14* intron (subgroup IB4, 1,686 nt) has only been described in *A. bisporus* H97 and was previously shown to harbor a highly eroded *heg* (encoding a HE of the LAGLIDADG superfamily). According to the high erosion of this gene, no putative catalytic was evidenced. Moreover, the erosion of the *heg* argues for the lack of mobility of this intron and an evolution toward its elimination from the mitochondrial genome (Ferandon et al. 2010; Gimble 2000). Consequently, its molecular evolution would not be hampered by any selective pressure, especially in the intron loop sequence carrying the eroded *heg*.

The intron secondary structures were deduced based on three types of analyses. The first type of analyses compared our sequences with conserved sequences P, Q, R, and S of the intron cores and with the base-paired regions P1–P9 using the RNA-Weasel software (<http://www.mega.sun.bch.umontreal.ca/RNAweasel/>). The second analysis focused on the three-dimensional models of group I introns (Michel and Westhof 1990). The third analysis compared

the putative secondary structures of the introns to those in the intron database established by Damberger and Gutell (1994) and in the organelle genome database Gobase by O'Brien et al. (2009).

DNA extraction, primer design, and PCR amplification

Total DNAs were extracted from 0.2 g of frozen mycelia after grinding in liquid nitrogen, according to the *N*-cetyl-*NNN*-trimethyl ammonium bromide (CTAB) procedure adapted to small quantities of mycelia as described in Barroso et al. (1995).

All primer pairs were synthesized by Sigma-Aldrich, France. Sequences of all primers used in this study are listed in Table 2.

From the sequence of the *cox1* gene of *A. bisporus* strain H97 (GenBank Acc. No. JX271275), three pairs of primers i10U/i10R, i11U/i11R, and i14U/i14R were designed to amplify introns *iAbi10*, *iAbi11*, and *iAbi14*, respectively. The i10U primer was located, upstream *iAbi10* in the *cox1* exon 10. The i10R primer was located on the reverse complementary strand in a sequence overlapping the 3' end of *iAbi10* and the exon 11, due to the small size (11 nt) of this exon. The primer i11U was overlapping the exon 11 and the 5' end of *iAbi11*, and the primer i11R was designed in the exon 12 of the *cox1* CDS of strain H97. The i14U primer was located upstream *iAbi14* in the *cox1* exon 14, and the i14R primer was located on the reverse complementary strand in the *cox1* exon 15.

From the sequence of the mitochondrial genome of *A. bisporus* var. *bisporus* homokaryotic strain H97 (GenBank Acc. No. JX271275), three pairs of primers were defined. The A6U/A6R pair of primers allowed the amplification and sequencing of 742 nt encoding the central region from aa 22 (nt 64) to aa 268 (nt 805) of the ATP6 protein (276 aa). The IGU/IGR pair of primers allowed the amplification of an intergenic sequence (*mt-ig*) constituted by a 668-nt region located on the mtDNA of *A. bisporus* H97 between the *nad6* and *atp6* gene (Ferandon et al. 2013). The RPU/RPR pair of primers was used to amplify a sequence encoding the central part from aa 674 (nt 122,540, Gen bank Ac No. JX271275) to aa 939 (nt 123,316) of the RPO protein (1,102 aa). This *rpo* gene is considered as a highly eroded and non-functional structural gene with plasmid origin and on the way to the elimination of the mitochondrial genome (Robison et al. 1991). Important rearrangement events such as length mutations by insertions and/or deletions, occurring in the integrated copy, have led to the distribution of the RPO CDS between the three reading frames.

Specific primers of three nuclear genes were used. The universal primer pair ITS5/ITS4 was used to amplify the

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequence	Amplified sequence	Position	References
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	ITS1/5.8S/ITS2 complete region	nt 1 (5' end ITS1)-nt 652 (3' end ITS2), Acc No. KF848690	White et al. (1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC			
N150U ^a	CAATCTCAAGCTTGCCTGG	<i>frk</i>	nt 1 (aa 1: M)-nt 750 (aa 249), Acc No. KF848701	Imbernon et al. (1996)
N150R	AGGTGACATGTCAGAAGCGC			
AbRpb2- 5F	GATGATCGTGATCATTTCGG	<i>rpb2</i>	nt 791 (aa 227)-nt 1,577 (aa 488) of the gene (exon 3), Acc No. AF107785	Schoch et al. (2009)
Rpb2-b7R	ACYTGRTTTRTGRTCRGGGAHV			
i10U	CCGACATAAATTTCAATA	<i>iAbi10</i>	nt 1-nt 1,741 of the mitochondrial intron, Acc No. JX271275	This work
i10R	ACCAAAGAACCATTCTTT			
i11U	GGTTCTTTGGTCAAATTAATA	<i>iAbi11</i>	nt 182-nt 2,077 of the mitochondrial intron, Acc No. JX271275	This work
i11R	CTATACCAAATCCTGGTAT			
i14U	TGGATACGAGAGCTTATTTTC	<i>iAbi14</i>	nt 101-nt 1,598 of the mitochondrial intron, Acc No. JX271275	This work
i14R	CCAAGAAAAGATTTTAATACC			
A6U	TATCTTATCTCCATTAAGTC	<i>atp6</i>	nt 64 (aa 22)-nt 805 (aa 268) of the mitochondrial gene, Acc No. JX271275	This work
A6R	TTACTTCATTCTTAAGATAGG			
IGU	GCTCGCATATTGGTATTG	<i>nad6-atp6</i> intergenic sequence (<i>mt-ig</i>)	nt 117,416-nt 118,087 of the mitochondrial genome, Acc No. JX271275	This work
IGR	GCCGTAATCTTTAAAGAC			
RPU	GTTGATAAGACATCTAAAC	<i>rpo</i>	nt 122,540 (aa 674)-nt 123,316 (aa 939) of the mitochondrial genome, Acc No. JX271275	This work
RPR	GTATATTTAGCTAAGCTTAGC			

^a U and R correspond to primers located on the sense and reverse complementary strand of the CDS, respectively

nuclear internal transcript spacer region (ITS1/5.8S/ITS2) of the ribosomal DNA (White et al. 1990). A central region of *rpb2* gene was amplified using primers (AbRpb2-5F and Rpb2-b7R (Schoch et al. 2009). From the sequencing of the probe P1N150 used as RFLP marker in Xu et al. (2002), a primer pair was previously designed to generate a CAPS marker PR006 by Imbernon et al. (1996). This pair of primers was used to amplify a region of the *frk* gene.

The PCR mixes contained 10–100 ng of fungal DNA, 1 µM of both primers, 200 µM of each dNTP, 2 units of GoTaq DNA polymerase (Promega Corp., Madison, Wis, USA), in a final volume of 50 µl enzyme buffer. The conditions for PCR were as follows: an initial denaturation step at 95 °C for 5 min followed by 30 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s; hybridization at two degrees below the lowest T_m of both primers for 30 s and elongation at 72 °C for 1 or 2 min. A final 5-min incubation at 72 °C was performed.

DNA sequencing and sequence analysis

The PCR products were sequenced on both strands by Beckman Coulter Genomics (UK), using each primer of the PCR and, for long sequences, internal primers deduced from the sequence. The GenBank Accession numbers of the sequenced PCR products are indicated in supplementary Table S1.

Comparisons with sequences of the GenBank and EMBL databases were performed with the search algorithm

BLAST (Altschul et al. 1990). Multi-alignments of nucleic acids were performed with Clustal W algorithm (Thompson et al. 1994).

Intraspecific nucleotide diversity and inferred genetic distance

A rate of intraspecific nt variation (substitutions plus single nt indels) was determined for each type of mitochondrial (*atp6*, *rpo*, *mt-ig*), intronic (*iAbi9'*, *iAbi10*, *iAbi11*, and *iAbi14*), and nuclear (ITS, *rpb2*, and *frk*) sequences. In each case, this rate was estimated by the number of SNPs (P) deduced from the alignment, divided by the size of the aligned sequences (S) and multiplied by 1,000. Hence, this rate is defined as the number of SNPs carried by a 1-kbp sequence. The intraspecific values were deduced from the alignments of the orthologous sequences of the eleven *A. bisporus* strains. To determine the interspecific values, the orthologous sequence of *A. devoniensis* CA40 was added to each alignment.

For genetic distance analyses, alignments were manually checked for accuracy and submitted to PowerMarker version 3.25 (Liu and Muse 2005) and BIONJ algorithm (Gascuel 1997) followed by TreeDyn for tree drawing (Chevenet et al. 2006). Reliability of branches was assessed by a bootstrap analysis (Felsenstein 1985). One thousand replicates were employed to determine confidence in the branches order. This bootstrap analysis was performed online at the Bioinformatics platform

(<http://www.phylogeny.fr>) as described by Dereeper et al. (2008, 2010).

Results

Molecular variability of the group I intron *iAbi10* and comparison with *iAbi9'*

The PCR was carried out using i10U/i10R primer pair and the total DNA of the selected French *A. bisporus* wild-type strains. Sequences of the PCR products (Supplementary Table S1) have shown that four out of nine *A. bisporus* var. *bisporus* strains (Bs228, Bs240, Bs251, and Bs256) possessed a 1,741-nt sequence (as i10R overlapped the intron 3' end, the 42 last nt of the intron could not be determined) strictly identical between them. These sequences possessed five nt substitutions and three nt indels with the *iAbi10* intron sequence previously reported in the *cox1* gene of strain H97 (Fig. 1b).

In four other *A. bisporus* var. *bisporus* strains (Bs177, Bs254, Bs262, and Bs363), as well as in *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* strain Bs423, the *iAbi10* intron was absent and replaced by another group I intron. The establishment of the secondary structure of this intron (Fig. 2) showed that it had a size of 1,658 nt and was located two nt upstream the insertion site of *iAbi10* in the *cox1* exon10 (Fig. 1a, f). The sequences of this intron that we named *iAbi9'* were strictly identical in the four *A. bisporus* var. *bisporus* strains with the exception of one nt insertion (C) in the Bs254 strain at position nt 965. When compared with *iAbi9'* consensus sequence, the *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* strain Bs423 differed by only one nt substitution and two nt insertion (Fig. 1d).

In the classification of the *cox1* group I introns established by Ferandon et al. (2010) and based on the precise position of their insertion site in the *cox1* CDS, it has been shown that all the introns belonging to the same position class (Pcl) share the highest sequence identities at the nt level and also at the level of the aa of the HE encoded by the intron. In this classification, *iAbi10* is a member of the widely distributed Pcl "P." The *iAbi9'* intron does not belong to a previously defined Pcl.

The *iAbi10* and *iAbi9'* introns possess a high percentage of nt identity (99 %) for the 302 last nt constituting the intron 3' ends and corresponding to the helices P4–P9, suggesting that both introns possess the same core sequence in their 3' region and belong to the same subgroup ID (Michel and Westhof 1990; Saldanha et al. 1993). On the contrary, the 1,356-nt sequence constituting the 5' end and the central part of the *iAbi9'* intron (which also encode the *heg*) possesses only 50 % of nt identity with the *iAbi10* corresponding sequence. No patches of

high sequence identity were found between these intronic regions. This leads to the differences observed in the secondary structure of the 5' and central region of both introns (the presence of an additional helix P2.1 and P3.1 in *iAbi10* and *iAbi9'*, respectively). All these results confirm that *iAbi9'* and *iAbi10* constitute different group I intron, in accordance with their different insertion sites separated by two nucleotides in the exon sequence (Fig. 1f).

A BLASTX analysis indicated that a large ORF (900 nt) occupies the 5' end of the *iAbi9'* intron. This ORF putatively encodes a HE of 300 amino acids belonging to the LAGLIDADG superfamily with two catalytic domains, as defined by Pellenz et al. (2002). This HE possess only 41 % of amino acid identity with the HE encoded by *iAbi10*, confirming that *iAbi9'* is not an ortholog of *iAbi10* and belongs to a new Pcl that we named Pcl O'.

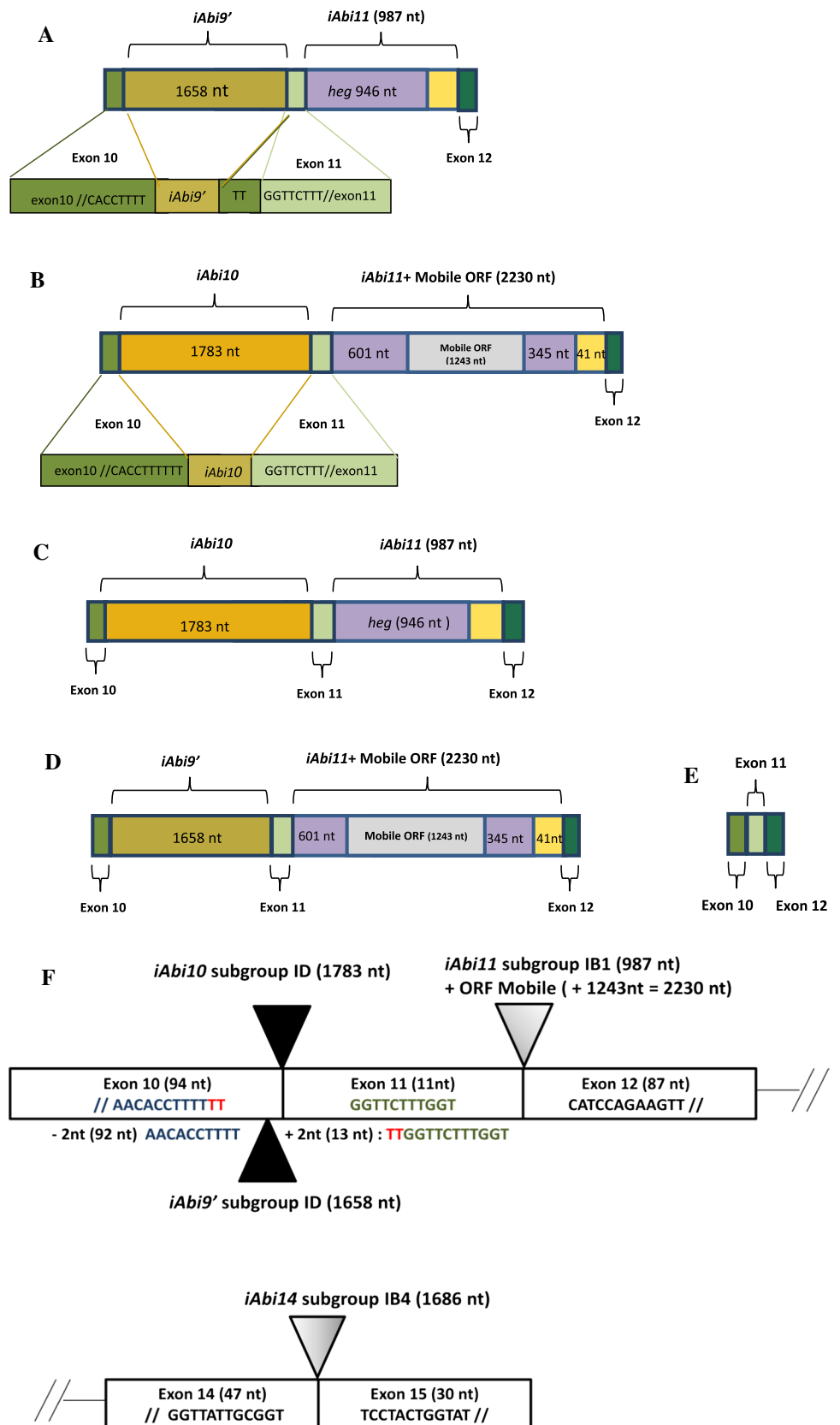
The *A. bisporus* var. *bisporus* strain Bs243 (Fig. 1e) did not possess any intron orthologous to *iAbi10* or *iAbi9'*, that is, there is no intron between *cox1 iAbi9* and *iAbi12* that are both present in the *cox1* gene of this strain (data not shown).

The phylogenetically closely related *A. devoniensis* strain CA40 was shown to possess an intron sequence orthologous to *iAbi10* (Fig. 1c). When aligned with the *iAbi10* sequence of *A. bisporus* var. *bisporus*, the *A. devoniensis* sequence (1,741 nt) was shown to carry 43 nt substitutions and five small indel sequences of 1–4 nt, leading to 97.3 % of nt id between both sequences.

Molecular variability of the group I intron *iAbi11*

The large *A. bisporus iAbi11* intron (2,230 nt) belongs to the Pcl Q, which groups numerous introns sharing the same position in the *cox1* CDS of species widely distributed in eukaryotic lineages (Ferandon et al. 2010). In *A. bisporus* strain H97, the *heg* carried by *iAbi11* was shown to be split by a mobile ORF of 1,243 nt (Fig. 1b). The putative HE encoded by this mobile ORF only showed low % of aa identity with HE described in the mitochondrial *cob* gene of other fungi such as the Ascomycota *Giberella zea* (50 % aa id) or *Podospora anserina* (47 % aa id). The mobile ORF is in frame with the 5' end (601 nt) of the *cox1* resident *heg* but not with its 3' end (345 nt). From this, the mobile ORF was considered as an "invading" *heg* because (1) it splits the *iAbi11* recipient *heg* into two parts (it is to be noted that several unsplit orthologs of this "recipient" *heg* were reported in *cox1* introns of various Ascomycota including *P. anserina* (*cox1 i9*) or *G. zea* (*cox1 i5*); and (2) the mobile ORF appears to be related by its sequence to *heg* carried by introns located in another mitochondrial gene than *cox1*: the *cob* gene.

Fig. 1 Variability of the molecular organization of the *coxI* region harboring the *iAbi9'*, *iAbi10*, and *iAbi11* introns among the *Agaricus* studied strains. **a** *A. bisporus* var. *bisporus* strains Bs177, Bs254, Bs262, Bs363; **b** *A. bisporus* var. *bisporus* strains H97, Bs228, Bs240, Bs251; Bs 256; **c** *A. devoniensis* strain CA40; **d** *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* Bs423; **e** *A. bisporus* var. *bisporus* strain Bs243. Sizes of the exons and introns, exact target sequences (the 12 first and last nt flanking introns in the exonic sequences), and subclass of each intron are now indicated in **f**



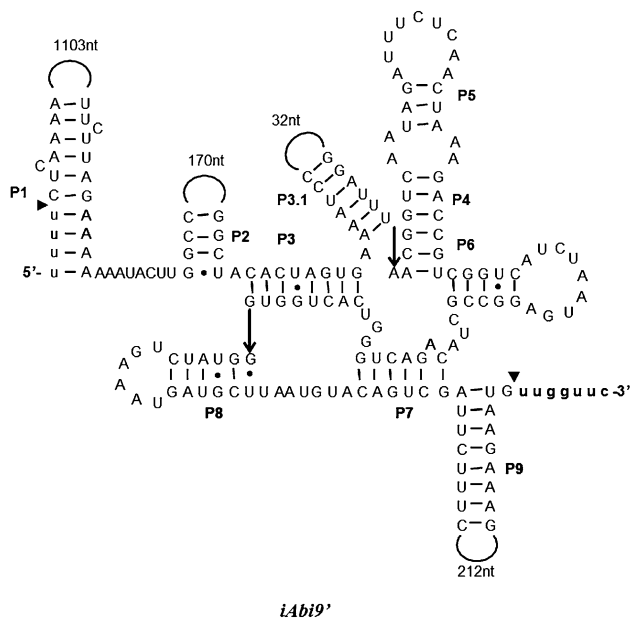


Fig. 2 Secondary structure of the *iAbi9'* intron. The 5' and 3' splicing sites are indicated by *small triangles*; the exon sequences by *lower case letters*

The presence of *iAbi11* intron was investigated by PCR using a couple of primers i11U/i11R (Table 2). Sequences of the PCR products have shown that, in four *A. bisporus* var. *bisporus* strains (Bs228, Bs240, Bs251, and Bs256), the *iAbi11* intron possessed the same puzzling organization than that described in strain H97, i.e., the presence of an invading *heg* located in the central region of the *cox1* *iAbi11* recipient *heg* (Fig. 1b). All these introns possessed a strictly identical sequence (1,896 nt were aligned constituted by a 5' partial–3' partial sequence corresponding to 85 % of the *iAbi11* with mobile ORF). In the four *A. bisporus* var. *bisporus* strains where *iAbi10* was “replaced” by *iAbi9'* (Bs177, Bs254, Bs262, and Bs363), the invading *heg* was not present in the resident *cox1* *heg* of *iAbi11* (Fig. 1a). The sequences of these four *iAbi11* introns with an unsplit *heg* were strictly identical between them and also when compared with the sequence of the H97 strain deleted of the invading *heg*.

In *Agaricus bisporus* var. *eurotetrasporus* strain Bs423 (Fig. 1d), the *iAbi11* *heg* was also split by the invading *heg*. When aligned with the orthologous *Agaricus bisporus* var. *bisporus* sequences, the % of nt id was equal to 100 %. On the contrary, the *iAbi11* intron of the *A. devoniensis* strain (Fig. 1c) possessed a *heg* without invading mobile ORF and a % of nt id with orthologous *A. bisporus* strains equal to 98.5 % (11 nt substitutions/730 aligned nt).

As reported above for *iAbi10* or *iAbi9'*, the *A. bisporus* var. *bisporus* strain Bs243 (Fig. 1e) did not possess any intron orthologous to *iAbi11*.

Molecular variability of the group I intron *iAbi14* remnant sequence

All the studied *A. bisporus* strains possessed an ortholog of *iAbi14* carrying a highly eroded *heg* (Supplementary Table S2). The erosion was confirmed by a BLASTX analysis which failed to reveal a large open reading frame encoding a putative HE. Only a region of about 700 nt located in the 3' region of the *iAbi14* intron and carrying several stop codons presented limited aa id (33 %) and aa similarity (56 %) at the level of the putative encoded protein with an HE (LAGLIDADG family) described in *Fusarium graminearum* (GenBank Accession No.: YP_001249330.1).

The alignment of the *iAbi14* orthologs revealed two major groups of *A. bisporus* var. *bisporus* strains, corresponding to the groups previously deduced from the analysis of *iAbi9'*, *iAbi10*, and *iAbi11* with or without the mobile ORF. Indeed, the first group (Bs177, Bs254, Bs262, and Bs363) was characterized by *iAbi9'* and the lack of the mobile ORF in *iAbi11* (Fig. 1a). The second group (Bs228, Bs240, Bs251, Bs256, and H97) was characterized by both the presence of *iAbi10* and of the mobile ORF in the *heg* of *iAbi11* (Fig. 1b). The *iAbi14* orthologous sequences of each group differed by seven SNPs. In the second group of strains, Bs228 and H97 possessed one and two specific SNPs, respectively.

The sequence of the *iAbi14* intron carried by the Bs243 strain (Fig. 1e), which did not possess *iAbi9'*, *iAbi10*, and *iAbi11* introns, was found closely related to the sequence of the second group of strains from which it differed by two nt substitutions. On the contrary, the *iAbi14* sequence of *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* strain Bs423, which possessed *iAbi9'* and *iAbi11* with the mobile ORF (Fig. 1d), was related to the first group of strains from which it differed by six nt substitutions.

Agaricus devoniensis strain CA40 carried an ortholog of *iAbi14* showing 33 SNPs when aligned with the sequences of the second group of strains, leading to 97.8 % of nt identity.

Intraspecific molecular variability of the mitochondrial *atp6* coding sequence

The *atp6* gene, encoding the small subunit 6 of the ATP synthase, is a gene carried by all the fungal mitochondrial genomes described to date and which has been previously used for phylogenetic studies of species belonging to the *Agaricus* genus at the interspecific level (Robison et al. 2001). At the intraspecific level, alignments of the 742 nt encoding the central region from aa 22 (nt 64) to aa 268 (nt 805) of the ATP6 protein have shown high conservation of these sequences. Indeed, all the studied strains belonging to the *A. bisporus* var. *bisporus* as well as var. *eurotetrasporus*

differed by only one nt substitution: the nt G at position 167 in Bs177, Bs254, Bs262, Bs363, and var. *eurotetrasporus* Bs423 was replaced by an A in the other studied strains including H97. When compared with the *A. devoniensis* strain CA40, the *atp6* sequence revealed 98.7 % of nt id (10 nt substitutions).

Molecular variability of a mitochondrial intergenic region (*mt-ig*)

In *A. bisporus* H97, the intergenic sequence *mt-ig* (668 nt in length) between the *nad6* and *atp6* genes was chosen for its proximal location to the studied coding sequences *cox1* and *atp6* (Ferandon et al. 2013) and because it did not show nt identity with any of the described fungal mitochondrial sequence in the GenBank. Amplification products of *mt-ig* regions were obtained, sequenced, and aligned (Supplementary Table S3). Five SNPs plus a microsatellite sequence of the type (A)_n with *n* ranging from 6 to 11, beginning at position nt 497, were evidenced. From this, omitting the microsatellite site, the % of nt id varied from 99.4 to 100 %. These five SNPs allow the distribution of the *A. bisporus* var. *bisporus* strains in two groups: (1) Bs177, Bs254, Bs262, and Bs363 in a group defined by a strictly identical sequence and a (A)₆ microsatellite sequence, and (2) Bs228, Bs240, Bs243, Bs251, Bs256, and H97 in a second group with a strictly identical sequence and a longer (A)_{9–11} microsatellite. Interestingly, with the exception of the strain Bs243 lacking *iAbi9'*, *iAbi10*, and *iAbi11* introns, both groups were already shown to be discriminated by the presence of *iAbi10* versus *iAbi9'* and the presence of the invading ORF in *iAbi11* in the second group of strains. From this, it appears that the intraspecific variability mediated by group I intron mobility would be related to the sequence evolution by nt substitution.

The *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* Bs423 shares three SNPs with the second group of *A. bisporus* var. *bisporus* strains.

When compared with the *A. bisporus* corresponding sequences, the intergenic sequence of *A. devoniensis* strain CA40 possessed 100 % of nt identity with the sequences of the *A. bisporus* strains belonging to the second group and carried an even longer microsatellite sequence (A)₁₂.

Molecular variability of a mitochondrial remnant sequence (*rpo*)

The RPU/RPR couple of primers was used in PCR with the DNA of the studied strains to amplify a remnant of a RNA polymerase gene (*rpo*) resulting from the integration of a linear invertron-like plasmid in the mitochondrial genome of *A. bisporus* (Robison et al. 1991). The aligned *rpo* sequences of all the *A. bisporus* var. *bisporus* strains were

found to be strictly identical. Only the *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* was shown to differ by four SNPs, leading to 99.5 % of nt id.

Contrasting with this high intraspecific conservation, *A. devoniensis* orthologous sequence presented numerous SNPs (38) and three single nt deletions leading to 94.7 % of nt id when compared with the *A. bisporus* strains.

Intraspecific molecular variability of the nuclear rDNA region

The ITS1/ITS2 region of the nuclear ribosomal unit was chosen to study the intraspecific variability of a nuclear noncoding sequence because it is the most commonly used marker in phylogenetic studies of Basidiomycota (Schoch et al. 2012). For all studied *A. bisporus* strains, the amplified sequences had a size of 651–652 nt. The ITS1, ITS2, and rDNA 5.8S sequences had a size of 289–290 nt, 208 nt, and 154 nt, respectively, with a single nt deletion in the ITS1 region of strain H97 (position nt 140) and of *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* strain Bs423 (position nt 103). From the alignment, representing 20 nuclear allelic sequences (indeed, there are two alleles in each of the nine heterokaryotic strains and only one in the homokaryotic strains H97 and Bs423), 13 SNPs were found (Supplementary Table S4) among which seven and six were located in the ITS1 and ITS2, respectively. Hence, the nt variation (nt substitution + single nt indel) rate was $7/289 = 2.4$, $6/208 = 2.9$, and $13/652 = 2.0$ % for ITS1, ITS2, and the total amplified sequence (ITS1/5.8S/ITS2), respectively. According to the dikaryotic status of most of the studied strains (except H97 and Bs423), 11 SNPs (Supplementary Table S4) were present as heteromorphisms (two different alleles in the same strain) in a low number of strains (one to three). Additionally, each heterokaryotic strain carried zero (in Bs228, Bs251, or Bs363) to five (in Bs240) heteromorphisms.

For comparison, the *A. devoniensis* ribosomal region was shown to possess 95.7 % of nt identity (28 SNPs) with the *A. bisporus* sequences.

Intraspecific molecular variability of the central region (exon 3) of the nuclear *rpb2* gene

The nuclear *rpb2* gene (2,905 nt encoding 914 aa and whose CDS is split by three small introns of size between 51 and 60 nt) encodes the second largest subunit (subunit 2) of the DNA-directed RNA polymerase II (Kolodziej et al. 1990). Orthologous sequences of this conserved housekeeping gene have been largely used in taxonomic and phylogenetic studies of various fungal species (Schoch et al. 2009; O'Donnel et al. 2013).

A central region of 787 nt of the *rpb2* gene, corresponding to the nt 791 (aa 227), i.e., the first nt of the exon 3, to nt 1,577 (aa 488) was amplified and then sequenced for the studied *A. bisporus* strains. Their alignment led to evidence 17 loci (Supplementary Table S5) presenting SNPs. According to the coding feature of this gene, no indel sequence was found. Concerning the distribution of the SNPs, strains were possessed between two (Bs228) and seven SNPs (indicated by red letters in Supplementary Table S5). *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* Bs423 possess four SNPs which is not found in the *A. bisporus* var. *bisporus* strains.

Similar to the ribosomal region and according to the dikaryotic status of the studied strains, six SNPs were present as heteromorphisms (heteroallelisms) in some strains. Each strain carried from zero (in Bs243 and Bs251) to three heteromorphisms (in Bs177, Bs254, Bs256, Bs262, and Bs363). The % of nt id between the *A. bisporus* strains varied from 99.7 to 99.1 %. The alignment of the *A. devoniensis* orthologous sequence shows 41 SNPs leading to 94.7 % of nt identity.

Intraspecific molecular variability of the nuclear gene *frk*

The *frk* gene was deduced from a previously reported CAPS marker with high discriminating ability among *A. bisporus* strains (Imbernon et al. 1996). PCR amplification of the *frk* gene resulted in a 750-nt sequence constituted by a large ORF putatively encoding a 250-aa protein with significant homology (56 % of aa id and 73 % of aa sim) with the NH2 region of a protein of the PKC-like superfamily: the fructosamine kinase of the Basidiomycota *Lentinula edodes* (GenBank Accession No.: AEN14443.1). From this, it appears that the CAPS marker corresponds to the 5' region of a nuclear gene encoding a part of the fructosamine kinase. To our knowledge, there is no enough data allowing to consider or not this gene as a conserved housekeeping gene. The sequences obtained with the *A. bisporus* strains were aligned. This led to evidence 32 SNPs (indicated by red letters in Supplementary Table S6). As expected for putatively functional structural genes, no indel was found in the studied strains. According to the heterokaryotic status of the strains, most (23) of the SNPs were present as heteromorphisms. However, the Bs177 strain did not carry any heteromorphism while the other heterokaryotic strain possessed from 6 (Bs243) to 15 heteromorphisms (Bs228 and Bs262). The homokaryotic strain H97 and the haploid *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* strain Bs423 possessed three and six specific SNPs, respectively. The % of nt id between the studied *A. bisporus* strains varied from 97.3 to 99.5 %. For comparison, the *A. devoniensis* sequence possessed only 79.2 % of nt id with *A. bisporus*.

Intraspecific nucleotide diversity and inferred genetic distance

A rate of intraspecific nt variation (substitutions plus single nt indels) was determined for each type of mitochondrial (*atp6*, *rpo*, *mt-ig*), intronic (*iAbi9'*, *iAbi10*, *iAbi11*, and *iAbi14*) and nuclear (ITS, *rpb2*, and *frk*) sequences.

As shown in Table 3 and in Fig. 3a, mitochondrial sequences were characterized by low intraspecific nt variation rates, especially for the coding *atp6* gene (1.35 SNPs/kbp) but also for the eroded *rpo* gene (5.15 SNPs/kbp). This low rate of nt variation of the *rpo* sequence is surprising for a gene described as a remnant on the way of elimination. The intergenic noncoding *mt-ig* sequence possessed a higher but still low rate of nt variation equal to 7.49 SNPs/kbp.

Concerning the intron sequences, the rates varied from zero (*iAbi11* with or without ORF) to 4.60 SNPs/kbp (*iAbi10*) and up to 8.01 SNPs/kbp for *iAbi14* carrying an eroded *heg*. These low values of nt variation for intron sequences suggest that a selective pressure is acting on the studied introns except *iAbi14*.

On the contrary, each of the three studied nuclear sequences possessed a higher intraspecific rate of nt variation than mitochondrial sequences. They ranged from 21.60 SNPs/kbp (*rpb2*) to 42.67 SNPs/kbp (*frk*), and the noncoding sequence ITS1/ITS2 possessed an intermediate rate equal to 26.10 SNPs/kbp. Hence, both coding structural genes showed a rate of nt variation similar to (for *rpb2*) or largely higher (for *frk*) than the noncoding sequence ITS1/ITS2. This can be explained by the fact that the ITS sequence is a part of the highly repeated ribosomal unit and would be affected by a process known as concerted evolution (Arnheim et al. 1980; Fuertes Aguilar et al. 1999). This mechanism leads to the homogenization of ribosomal DNA tandem repeats, thus preventing the spreading of nt variations and consequently decreasing the observed rate of nt variation in this sequence.

To extend the analysis, the mitochondrial (*atp6*, *rpo*, *mt-ig*), intron (*iAbi9'*, *iAbi10*, *iAbi11*, and *iAbi14*), and nuclear (ITS1/ITS2, *rpb2*, and *frk*) sequences were separately compiled and the rates of intraspecific nt variation were compared (Fig. 3b). The intron and mitochondrial sequences possessed low rates of nt variation equal to 4.08 and 4.57 SNPs/kbp, respectively, while nuclear sequences possessed a rate of nt variation equal to 23.35 SNPs/kbp (more than 5 times higher than those of the mitochondrial and intron sequences).

The same type of analysis was carried out by comparing the rates of nt variation between (1) two coding structural genes: the mitochondrial *atp6* (1.35 SNPs/kbp) and the nuclear *rpb2* (21.60 SNPs/kbp) and (2) two noncoding sequences: the mitochondrial *mt-ig* (7.49 SNPs/kbp) and

Table 3 Intraspecific and interspecific nt variation rates of intronic, mitochondrial, and nuclear sequences, alone or compiled

	Sequence name	Intraspecific <i>A. bisporus</i>			Interspecific <i>A. bisporus/A. devoniensis</i>		
		Sequence size	SNPs	nt variation rate: SNPs/1 kbp	Sequence size	SNPs	nt variation rate: SNPs/1 kbp
		S	P	(P/S) X 1,000	S	P	(P/S) X 1,000
Intron	<i>iAbi9'</i>	1,658	4	2.41			
	<i>iAbi10</i>	1,741	8	4.60	1,741	43	24.70
	<i>iAbi11</i>	987	0	0	730	11	15.07
	<i>iAbi14</i>	1,498	12	8.01	1,498	33	22.03
mtDNA	<i>atp6</i>	742	1	1.35	742	10	13.48
	<i>mt-ig</i>	668	5	7.49	668	5	7.49
	<i>rpo</i>	776	4	5.15	776	41	52.84
nucDNA	<i>rDNA</i>	652	13	19.94	652	28	42.94
	<i>ITS1/ITS2</i>	498	13	26.10	498	28	56.22
	<i>rpb2</i>	787	17	21.60	787	41	52.10
	<i>frk</i>	750	32	42.67	666	156	237.80
Compiled mtDNA	mt intron	5,884	24	4.08	3,969	87	21.92
	mt noncoding	1,444	9	6.23	1,444	46	31.86
	mt CDS	742	1	1.35	742	10	13.48
	mt total (–intron)	2,186	10	4.57	2,186	56	25.62
	mt total (+introns)	8,070	34	4.21	6,155	143	23.23
Compiled nucDNA	nuc intergenic	498	13	26.10	498	28	42.94
	nuc CDS	1,537	49	31.88	1,453	197	135.58
	nuc CDS (–frk)	787	17	21.60	787	41	52.10
	nuc total	2,035	62	30.47	2,035	225	110.57
	nuc total (–frk)	1,285	30	23.35	1,369	69	50.4

the nuclear ribosomal region ITS1/ITS2 (26.10 SNPs/kbp). Indeed, the *rpb2* sequence has been chosen instead of *frk* sequence for comparison with *atp6* because it possessed the lowest rate of nt variation among the two nuclear coding sequences. The nt variation rates of nuclear coding and noncoding sequences were 16 and 3.5 higher than the corresponding mitochondrial ones, respectively (Fig. 3b).

At the interspecific level, between the *A. bisporus* strains and the strain CA40 of the phylogenetically close related species *A. devoniensis* (Fig. 3c), the results were similar to those obtained with *A. bisporus* at the intraspecific level: low nt variation rates for mitochondrial and intron sequences, and higher ones for nuclear sequences. Indeed, the *A. devoniensis* nuclear sequences possessed nt variation rates varying from 56.22 SNPs/kbp (ITS1/ITS2) to 237.80 SNPs/kbp (*frk*). For comparison, the number of SNPs/kbp was clearly lower, ranging from 13.48 SNPs/kbp (*atp6*) to 31.86 (noncoding sequences) for the mitochondrial genome and 21.92 SNPs/kbp for the intron sequences.

In an additional step, intron and mitochondrial sequences were used to construct distance trees. For the introns, the tree (Fig. 4b) was based only on the *iAbi14* sequences (1,498 nt) because the other introns were not present in

all the studied strains (*iAbi9'* and *iAbi10*) or did not carry any nt substitution (*iAbi11* with or without the mobile ORF). For mitochondrial sequences, distance trees were constructed by using *atp6* (742 nt, Fig. 4c), *mt-ig* (668 nt, Fig. 4d), and *rpo* (776 nt Fig. 4e) sequences independently or concatenated in a 2,186-nt sequence. The branches of the mitochondrial concatenated tree (Fig. 4a) were supported by bootstrap values higher than 60 %, and in accordance, this tree was found largely congruent with the mitochondrial single-sequence trees (*atp6*, *mt-ig*, and *rpo*) and also with the *iAbi14* intron tree. In all these trees except the *mt-ig* one (Fig. 4d), *A. devoniensis* ranged in an outgroup position and the *A. bisporus* var. *bisporus* strains were grouped into two major clades. The clade mt I grouped the Bs177, Bs254, Bs262, and Bs363 strains. The clade mt II grouped the remaining strains Bs228, Bs240, Bs243, Bs251, Bs256, and H97. It is to be noted that the high percentages of nt identity observed between some mitochondrial sequences, such as *rpo*, led to a failure of strain discrimination in the corresponding distance tree (Fig. 4e).

In the tree based on mitochondrial concatenated sequences, the distant strain Bs423 of *A. bisporus* var. *euro-tetrasporus* was located on a sister branch to mt I. However,

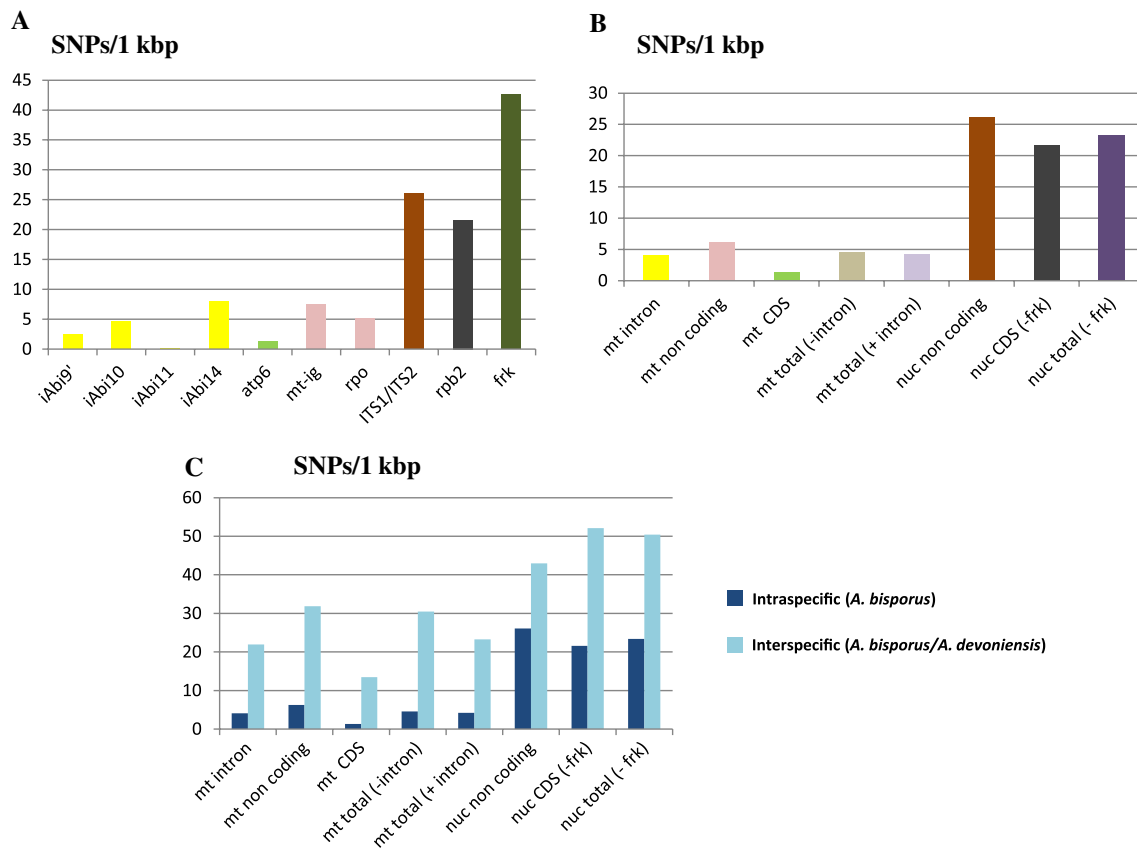


Fig. 3 Nucleotide variation rate (expressed as the number of SNPs for 1-kbp sequence) in the 11 *A. bisporus* strains for various types of intronic, mitochondrial, and nuclear sequences. Sequences are studied

alone (**a**) or compiled (**b**). The intraspecific (in *A. bisporus*) and interspecific (between *A. bisporus* and *A. devoniensis*) nt variation rates of compiled sequences are compared in **c**

in relation to the low rates of nt substitution observed with mitochondrial sequences, the position of strains in the distance trees can be subject to discussion, even if branches are supported by significant (relatively high) bootstrap values. This is particularly true for Bs423, which appears to be grouped with strains of clade mt I by one shared nt substitution in *atp6* sequences and with strains of clade mt II by three shared nt substitution in the *mt-ig* sequence. The concatenated mitochondrial (Fig. 4a) and intron (Fig. 4b) trees exhibited similar topology except that, in the mitochondrial tree, members of clade mt I and mt II formed two polytomies while, in the intron *iAbi14* tree, nodes and individual branches are present in both clades due to the highest nt variation rate observed in this eroded intron.

Discussion

In this study, mainly carried out at the intraspecific level with *A. bisporus* French wild-type strains, but also at the interspecific one with a strain representing the phylogenetically related species *A. devoniensis*, mitochondrial

sequences were characterized by low rates of nt variation, particularly when compared with nuclear ones. These low rates concerned all kinds of mitochondrial sequences: not only genic (structural gene *atp6*) but also intergenic and even optional sequences (such as eroded intronic *heg* or sequences resulting from the integration in the mtDNA of invertron-like linear plasmids). These low rates of nt variation were accompanied by a mobility (presence/absence) of group I introns in the *cox1* gene and also of an “invading” *heg* (mobile ORF). Such a correlation between mutation pressure and mobility of introns has previously been hypothesized by Lynch et al. (2006) from an interspecific comparative analysis of mitochondrial genomes in various eukaryotic lineages.

Our results argue for an important dynamics of group I introns able to be easily gained and/or lost. The intron gain is in accordance with the previously reported amazing features that the *A. bisporus cox1* gene and also its whole mtDNA constitutes large group I intron reservoirs (Ferdon et al. 2013). In fungi, such extensive intron invasion has been frequently reported from studies carried out in various species of the Ascomycota and Basidiomycota divisions

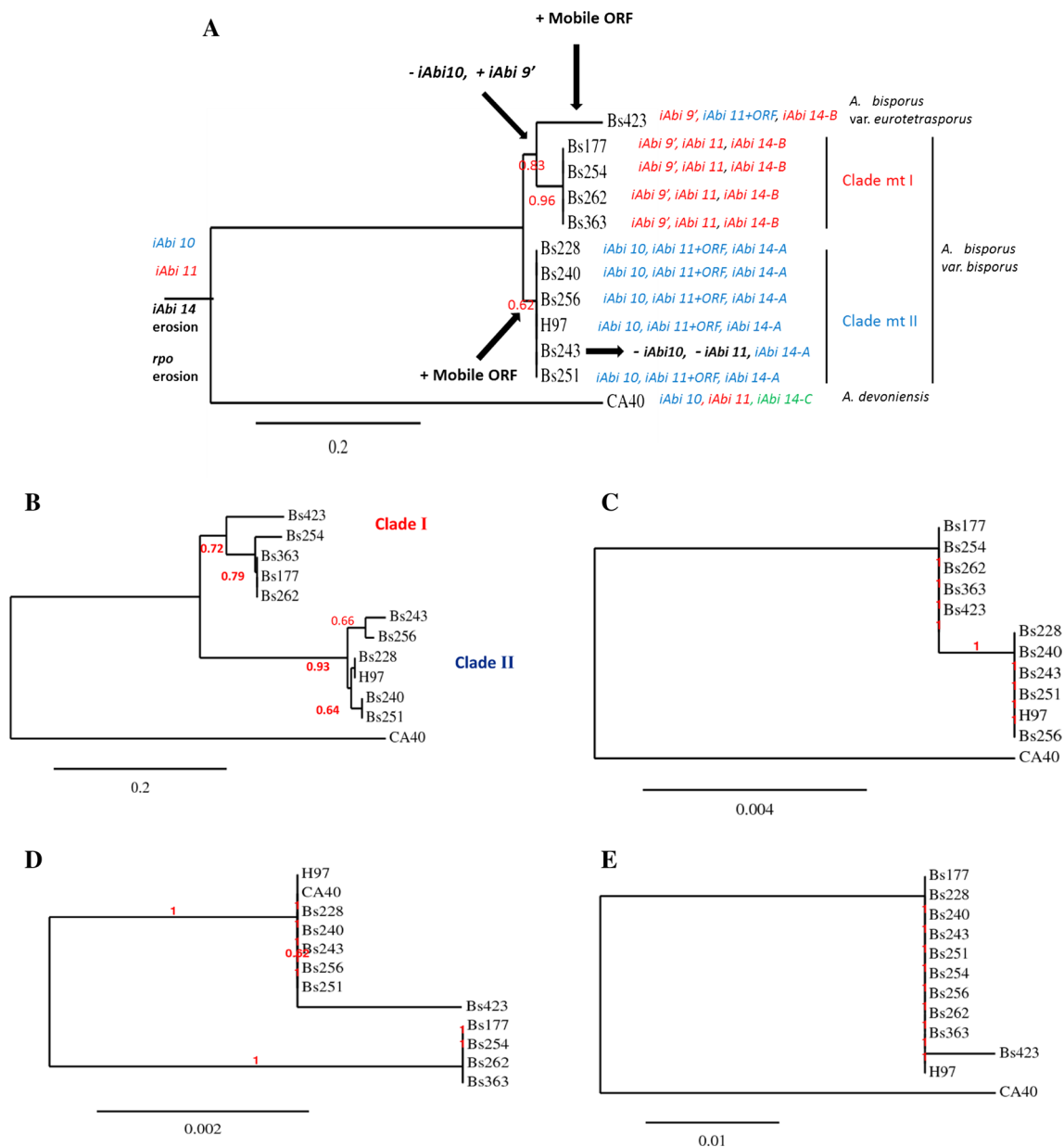


Fig. 4 Neighbor-joining distance tree for the 12 studied *Agaricus* strains. Trees are based on the concatenated mitochondrial sequences *atp6*, *mt-ig*, and *rpo* (a), on the mitochondrial intron *iAbl14* sequences (b) and on the *atp6* (c), on the *mt-ig* (d), and on the *rpo* (e) sequences. BioNJ trees were also constructed, found similar (data not

shown), and submitted to a bootstrap analysis (one thousand replicates) as described in the “Materials and methods” section. The bootstrap values higher than 60 % are indicated near their corresponding branches

(for recent reports, see Torriani et al. 2014; Losada et al. 2014; Salavirta et al. 2014). For example, by comparing, at the interspecific level, four closely related *Rhynchosporium* species, Torriani et al. (2014) have recently reported that three of these mtDNAs significantly expanded by gain of introns, representing from 8.1 % to about 40 % of the mitochondrial genome. However, contrasting with results in *Agaricus*, the mt mutation rate in *Rhynchosporium* was found 77 times higher than the nuclear one.

However, as emphasized in Ferandon et al. (2010), a survey of the *coxI* group I introns in eukaryotes suggests a general evolution toward the loss of introns (according to the “early intron” theory) contrasting with the occurrence of some species behaving as large intron reservoirs and whose *A. bisporus* mtDNA is one of the largest representative one (Ferandon et al. 2013), for a still unknown reason.

In the *A. bisporus* studied strains, the hypothetical and successive events of gain and loss of introns and/or *heg*

have been summarized on the mitochondrial concatenated tree of Fig. 4a.

According to this tree, the mobile ORF invading *iAbi11* would have been gained twice: once in strains of clade mt II and also once in strain Bs423. This can be interpreted as the occurrence of two independent events of gain, which, however, can be seen as unlikely. In this context, it could be hypothesized that one copy of the mobile ORF could have been introduced by mating followed by homing. This would explain that both intact and interrupted *iAbi11* alleles are found linked to *iAbi9'* and *iAbi10* and would be in accordance with the occurrence of a heteroplasmic state reported in Basidiomycota species where sexual matings rely on the fusion (somatogamy) of two vegetative homokaryotic mycelia (Barroso and Labarere 1997).

In a second hypothesis, there would be only one event of invasion and the position of strain Bs423 in the tree would be misleading; this strain being, in fact, related to clade mt II, as suggested by the tree of Fig. 4d was based on the single *mt-ig* sequences. In details, the strain Bs423 was found related to clade mit I by the presence of *iAbi9'* (as indicated in Fig. 4a), by the sequence of the eroded *heg* carried by *iAbi14* (Fig. 4b) and by one shared nt substitution in the *atp6* sequences (Fig. 4c). On the contrary, it was found related to clade mit II by three shared nt substitution in the *mt-ig* sequence (Fig. 4d). Unfortunately, this strain (which belongs to var. *eurotetrasporus*) appears phylogenetically distant from all the other strains belonging to the var. *bisporus* on the tree based on the mitochondrial sequences *rpo* (Fig. 4e) and also on trees based on nuclear sequences and particularly on the ITS1/ITS2 region (data not shown), thus preventing to convincingly address its phylogenetic relationships. Hence, it is to be noted that, in *A. bisporus*, ITS sequences appear not suitable for predicting intraspecies phylogeny, especially between strains representing different varieties.

In all cases, the different molecular architectures evidenced in the *cox1* gene cannot be only explained by intron or *heg* gains, but appear to also involve loss events, such as in the strain Bs243 (loss of *iAbi10* and *iAbi11*).

The hypothesis of an ancestral presence of *iAbi10* and *iAbi11* is based on (1) the wide occurrence of these introns in eukaryotic mitochondrial genomes, especially in fungal ones and also (2) on their presence in both *A. bisporus* and *A. devoniensis* strains, which can be seen as an ancestral character if considering that intron evolution mainly evolves to elimination from mitochondrial genomes ("early intron" theory) as hypothesized in Ferandon et al. (2010). It is to be noted that, if *iAbi10* was found in both *A. bisporus* and *A. devoniensis* species, *iAbi9'* appears as a "rare" intron specifically found in *A. bisporus*. But, of course, the existence of *iAbi9'* in other strains of *A. devoniensis* cannot be excluded. The *iAbi9'* encoded HE, possesses 100 %

of aa id with an hypothetical protein described in *A. bisporus* var. *burnettii* strain JB137-S8 (GenBank Accession No.: EKM74051.1) from the Californian desert, suggesting that this *A. bisporus* var. *burnettii* strain, which represents another geographically isolated variety of the *A. bisporus* species, possesses the same intron *iAbi9'* that some French isolates. This intron would have been recently acquired by some *A. bisporus* strains from an unidentified donor.

Based on the ancestral character of *iAbi10*, it is noteworthy that the proximity of the *iAbi9'* and *iAbi10* introns (separated by only 2 nt in the *cox1* CDS) implies the first loss of the ancestral *iAbi10* intron to gain, in a second step, *iAbi9'*. This is in accordance with the mechanistic requirement for intron transfer and homing, of a site recognized by the HE encoded by the intervening intron, in this case *iAbi9'*. This recognized sequence would not exist when *iAbi10* is present in the *cox1* gene. Indeed, the HE protein is an intron-encoded endonuclease, which is highly specific for the intronless allele. It binds to a long DNA site (14–30 nt) called homing site, which is composed of the flanking exon sequences into which the intron sequence will be copied. Once bound to the homing site, the HE cleaves this site. Then, the generated double-strand break will be repaired by cellular mechanisms relying on homologous recombination which will allow the transfer of the intron sequence to the cleaved allele (for details, see Chevalier and Stoddard 2001; Gimble 2000). From this, the presence of *iAbi10* (by interrupting the homing site recognized by the *iAbi9'*-encoded HE protein) prevents the binding of this HE and consequently the homing of the *iAbi9'* intron in a gene containing *iAbi10*.

However, the high conservation (strict nt identity) of the 3' region (302 nt) of both introns *iAbi9'* and *iAbi10* is striking and could suggest a particular (different from the HE-mediated homing) but still unknown mechanism of gain for the *iAbi9'* intron.

Finally, according to the phylogenetic tree, it will be noted that the scenario of a loss of *iAbi10* followed by the gain of *iAbi9'* is more sparing than the other hypothesis (loss of *iAbi9'* followed by a gain of *iAbi10*). Indeed, in the first hypothesis, *iAbi10* would have been lost twice (once in mt I clade, once in the Bs243 strain) and *iAbi9'* gained once (in mt I clade). In the second hypothesis, *iAbi9'* would have been lost twice (in clade mt II and in the *A. devoniensis* strain) and *iAbi10* gained also twice (in *A. devoniensis* and in clade mt II), then lost in strain Bs243 of this clade.

The *heg* hosted by the group I introns of our study can be divided into two groups. One group is constituted by *heg* maintained functional during evolution (*iAbi9'* and *iAbi10*). Another group is composed of eroded *heg* evolving toward their elimination (*iAbi14*). Interestingly, the *iAbi14* *heg* as well as the *rpo* gene, shared by all the strains of *A. bisporus* and *A. devoniensis*, appear highly eroded sequences

but these sequences would be conserved in their remnant state in the mtDNA of both studied species of *Agaricus*. This could be explained by a change in the mitochondrial genome evolution rate from rapid to low, as previously suggested in plants (Palmer et al. 2000) or in organisms near the root of the Metazoa phylogenetic tree such as coral (Hellberg 2006).

Finally, our results suggest that the mobility and accumulation of mobile genetic elements such as group I introns in the *A. bisporus* mtDNA could be in relation to a notably low rate of nt variation shared by coding and noncoding (intergenic) sequences of this genome. This stringent conservation of mitochondrial sequences, when compared with their nuclear counterparts, which appears irrespective of their apparent functionality, contrasts to what is widely accepted in fungal sequence evolution. Hence, it will be interesting to extend this study to several other fungal species, phylogenetically close related or not to *A. bisporus*, with the aim to determine whether this correlation is a shared phenomenon in fungi, especially in the Dikarya (Ascomycota and Basidiomycota divisions) in which large intron-rich mtDNAs have been reported.

Acknowledgments The authors thank the cultural service of French Embassy in Iran for the attribution of a research grant to Banafsheh Jalalzadeh. The authors also thank the French embassy in Senegal for the research grant U3E to Idy Carras Saré and the “Ministère de la recherche scientifique du Sénégal” as part of a “Program FIRST”.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical standards The authors declare that the experiments comply with the current laws of the countries, in which they were performed.

References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment searchtool. *J Mol Biol* 215(3):403–410
- Arnheim N, Krystal M, Schmickel R, Wilson G, Ryder O, Zimmer E (1980) Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on non-homologous chromosomes in man and apes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7323–7327
- Barroso G, Labarere J (1997) Genetic evidence for nonrandom sorting out of mitochondria in the basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Appl Environ Microbiol* 63(12):4686–4691
- Barroso G, Blesa S, Labarere J (1995) Wide distribution of mitochondrial genome rearrangements in wild strains of the cultivated Basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Appl Environ Microbiol* 61:1187–1193
- Burger G, Gray MW, Lang BF (2003) Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet* 19(12):709–716
- Callac P, Jacobé de Haut I, Imbernon M, Guinberteau J (2003) A novel homothallic variety of *Agaricus bisporus* comprises rare tetrasporic isolates from Europe. *Mycologia* 95(2):222–231
- Challen MP, Kerrigan RW, Callac P (2003) A phylogenetic reconstruction and emendation of *Agaricus* section *Duploannulatae*. *Mycologia* 95(1):61–73
- Chevalier BS, Stoddard BL (2001) Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Res* 29(18):3757–3774
- Chevenet F, Brun C, Banuls AL, Jacq B, Christen R (2006) TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinform* 7:439
- Cummings DJ, Mc Nally KL, Domenico JM, Matsuura ET (1990) The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospira anserina*. *Curr Genet* 17(5):375–402
- Damberger SH, Gutell RR (1994) A comparative database of group I intron structures. *Nucleic Acids Res* 22(17):3508–3510
- De la Bastide PY, Horgen PA (2003) Mitochondrial inheritance and the detection of non-parental mitochondrial DNA haplotypes in crosses of *Agaricus bisporus* homokaryons. *Fungal Genet Biol* 38(3):333–342
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36:W465–W469
- Dereeper A, Audic S, Claverie JM, Blanc G (2010) BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evol Biol* 10:8
- Felsenstein J (1985) Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791
- Ferandon C, Moukha S, Callac P, Benedetto JP, Castroviejo M, Barroso G (2010) The *Agaricus bisporus cox1* gene: the longest mitochondrial gene and the largest reservoir of mitochondrial group I introns. *PLoS One* 5(11):e14048
- Ferandon C, Xu JP, Barroso G (2013) The 135 kbp mitochondrial genome of *Agaricus bisporus* is the largest known eukaryotic reservoir of group I introns and plasmid-related sequences. *Fungal Genet Biol* 55:85–91
- Foulongne-Oriol M, Spataro C, Cathalot V, Monllor S, Savoie J-M (2010) An expanded genetic linkage map of an intervarietal *Agaricus bisporus* var. *bisporus* X *A. bisporus* var. *burnettii* hybrid based on AFLP, SSR and CAPS markers shed light on the recombination behaviour of the species. *Fungal Genet Biol* 47:226–236
- Fuertes Aguilar J, Rossello JA, Nieto Feliner G (1999) Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) concerted evolution in natural and artificial hybrids of *Armeria* (Plumbaginaceae). *Mol Ecol* 8:1341–1346
- Gascuel O (1997) BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* 14:685–695
- Ghikas DM, Kouvelis VN, Typas MA (2010) Phylogenetic and biogeographic implications inferred by mitochondrial intergenic region analyses and ITS1-5.8S-ITS2 of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii*. *BMC Microbiol* 10:174
- Gimble FS (2000) Invasion of a multitude of genetic niches by mobile endonuclease genes. *FEMS Microbiol Lett* 185:99–107
- Gogarten JP, Hilario E (2006) Inteins, introns and homing endonucleases: recent revelations about the life cycle of parasitic genetic elements. *BMC Evol Biol* 6:94
- Gray MW (2014) The pre-endosymbiont hypothesis: a new perspective on the origin and evolution of mitochondria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:3
- Gray MW, Burger G, Lang F (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283:1476–1481
- Hellberg M (2006) No variation and low synonymous substitution rates in coral mtDNA despite high nuclear variation. *BMC Evol Biol* 6:24
- Imbernon M, Callac P, Gasqui P, Kerrigan RW, AJ Velcko Jr (1996) BSN, the primary determinant of basidial spore number and reproductive mode in *Agaricus bisporus*, maps to chromosome I. *Mycologia* 88:749–761
- Kerrigan RW, Callac P, Parra LA (2008) New and rare taxa in *Agaricus* section *Bivelares* (*Duploannulati*). *Mycologia* 100:876–892

- Kolodziej PA, Woychik N, Liao SM, Young RA (1990) RNA polymerase II subunit composition, stoichiometry, and phosphorylation. *Mol Cell Biol* 10(5):1915–1920
- Liu K, Muse SV (2005) PowerMaker: an integrated analysis environment for genetic maker analysis. *Bioinformatics* 21:2128–2129
- Losada L, Pakala SB, Federova N, Joardar V, Shabalina SA et al (2014) Mobile elements and mitochondrial genome expansion in the soil fungus and potato pathogen *Rhizoctonia solani* AG-3. *FEMS Microbiol Lett* 352(2):165–173
- Lynch M, Koshela B, Schaack S (2006) Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. *Science* 311:1727–1730
- Michel F, Westhof E (1990) Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J Mol Biol* 216(3):585–610
- Morin E et al (2012) The genome sequence of the button Mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanism governing adaptation to a humic -rich ecological niche. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:17501–17506
- O'Donnell K, Rooney AP, Proctor RH, Brown DW, McCormick SP, Ward TJ, Frandsen RJN, Lysøe E, Rehner SA, Aoki T, Robert VARG, Crous PW, Groenewald JZ, Kang S, Geiser DM (2013) Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal Genet Biol* 52:20–31
- O'Brien EA, Zhang Y, Wang E, Marie V, Badejoko W, Lang BF, Burger G (2009) GOBASE—an organelle genome database. *Nucleic Acids Res* 37:D946–D950
- Palmer JD, Adams KL, Cho Y, Parkinson CL, Qui Y-L, Song K (2000) Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6960–6966
- Pellenz S, Harington A, Dujon B, Wolf K, Schafer B (2002) Characterization of the I-Spom I endonuclease from fission yeast: insights into the evolution of a group I intron- encoded homing endonuclease. *J Mol Evol* 55(3):302–313
- Raper CA, Raper JR, Miller RE (1972) Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 64(5):1088–1117
- Rice DW, Alverson AJ, Richardson AO, Young GJ, Sanchez-Puerta MV, Munzinger J, Barry K, Boore JL, Zhang Y, dePamphilis CW, Knox EB, Palmer JD (2013) Horizontal transfer of entire genomes via mitochondrial fusion in the angiosperm *Amborella*. *Science* 342:1468–1473
- Robison MM, Royer JC, Horgen PA (1991) Homology between mitochondrial DNA of *Agaricus bisporus* and an internal portion of a linear mitochondrial plasmid of *Agaricus bitorquis*. *Curr Genet* 19:495–502
- Robison M, Chiang B, Horgen P (2001) A phylogeny of the genus *Agaricus* based on mitochondrial *atp6* sequences. *Mycologia* 93(1):30–37
- Salavirta H, Oksanen I, Kuuskeri J, Makela M, Laine P, Paulin L, Lundell T (2014) Mitochondrial genome of *Phlebia radiata* is the second largest (156 kbp) among fungi and features signs of genome flexibility and recent recombination events. *PLoS One* 9(5):e97141
- Saldanha R, Mohr G, Belfort M, Lambowitz AM (1993) Group I and group II introns. *FASEB J* 7(1):15–24
- Schoch CL et al (2009) The Ascomycota tree of life: a phylum wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Syst Biol* 58:224–239
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Barcoding Fungal (2012) Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(16):6241–6246
- Specht CA, Novotny CP, Ullrich RC (1992) Mitochondrial DNA of *Schizophyllum commune*: restriction map, genetic map, and mode of inheritance. *Curr Genet* 22(2):129–134
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
- Torriani SFF, Penselin D, Knogge W, Felder M, Taudien S, Platzer M, McDonald BA, Brunner PC (2014) Comparative analysis of mitochondrial genomes from closely related *Rhynchosporium* species reveals extensive intron invasion. *Fungal Genet Biol* 62:34–42
- Ward BL (1981) The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (cucurbitaceae). *Cell* 25:793–803
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic press, San Diego, p 315–322
- Xu JP, Kerrigan RW, Callac P, Horgen PA, Anderson JB (1997) Genetic structure of natural populations of *Agaricus bisporus*, the commercial Button Mushroom. *J. Heredity* 88:482–488
- Xu JP, Kerrigan RW, Sonnenberg AS, Callac P, Horgen PA, Anderson JB (1998) Mitochondrial DNA variation in natural populations of the mushroom *Agaricus bisporus*. *Mol Ecol* 7:19–33
- Xu JP, Demerger C, Callac P (2002) Fine-scale genetic analysis reveals unexpected spatial-temporal heterogeneity in two natural populations of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology* 148:1253–1262

Table S1 GenBank Accession N° of the *A. bisporus* and *A. devoniensis* sequences determined in this study

Species	Strain	Mitochondrial			Intron			Nuclear		
		<i>atp6</i>	<i>rpo</i>	<i>mt-ig</i>	<i>iAbi9'</i>	<i>iAbi10</i>	<i>iAbi11</i>	<i>iAbi14</i>	<i>rpb2</i>	<i>frk</i> ITS
<i>A. bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	Bs177	KF784735	KF784746	KF784757	KF784773		KF784783	KF848668	KF848679	KF848701 KF848690
	Bs228	KF784736	KF784747	KF784758		KF784768	KF784778	KF848669	KF848680	KF848702 KF848691
	Bs240	KF784737	KF784748	KF784759		KF784769	KF784779	KF848670	KF848681	KF848703 KF848692
	Bs243	KF784738	KF784749	KF784760				KF848671	KF848682	KF848704 KF848693
	Bs251	KF784739	KF784750	KF784761		KF784770	KF784780	KF848672	KF848683	KF848705 KF848694
	Bs254	KF784740	KF784751	KF784762	KF784774		KF784784	KF848673	KF848684	KF848706 KF848695
	Bs256	KF784741	KF784752	KF784763		KF784771	KF784781	KF848674	KF848685	KF848707 KF848696
	Bs262	KF784742	KF784753	KF784764	KF784775		KF784785	KF848675	KF848686	KF848708 KF848697
	Bs363	KF784743	KF784754	KF784765	KF784776		KF784786	KF848676	KF848687	KF848709 KF848698
var. <i>eurotetrasporus</i>	Bs423	KF784744	KF784755	KF784766	KF784777		KF784782	KF848677	KF848688	KF848710 KF848699
<i>A. devoniensis</i>	CA40	KF784745	KF784756	KF784767		KF784772	KF848667	KF848678	KF848689	KF848711 KF848700

Table S2A Nucleotide variability of the sequences orthologous to intron *iAbi10*

Strain	nt position 972	nt position 973-974	nt position 983	nt position 1008	nt position 1011	nt position 1012	nt position 1013	Number of SNPs (/1741 aligned nt)
Bs228	G	D-D	D	T	T	C	T	0
Bs240	G	D-D	D	T	T	C	T	0
Bs251	G	D-D	D	T	T	C	T	0
Bs256	G	D-D	D	T	T	C	T	0
H97	A	G-A	A	D	G	T	C	8

When compared with the consensus sequence (composed by the most frequent allele found at each polymorphic nt position), the substituted or deleted (D) nt are framed in color.

Table S2B Nucleotide variability of the sequences orthologous to intron *iAbl9'*

Strain	nt position 724	nt position 965	nt position 1162	nt position 1237	Number of SNPs (/1658 aligned nt)
Bs177	G	D	D	D	0
Bs254	G	C	D	D	1
Bs262	G	D	D	D	0
Bs363	G	D	D	D	0
Bs423	A	D	A	G	3

When compared with the consensus sequence (composed by the most frequent allele found at each polymorphic nt position), the substituted or inserted/deleted (D) nt are framed in color.

Table S3 Nucleotide variability of the sequences orthologous to intron *iAbi14*

Strain	nt position 173	nt position 200	nt position 497	nt position 558	nt position 690	nt position 811	nt position 825	nt position 830	nt position 943	nt position 1022
Bs240	C	G	G	G	T	G	C	T	A	T
Bs251	C	G	G	G	T	G	C	T	A	T
Bs256	C	G	G	G	T	G	C	T	A	T
Bs228	C	G	G	G	T	G	C	T	T	T
H97	C	G	G	G	T	G	C	T	T	T
Bs262	T	G	G	A	C	G	T	A	T	G
Bs363	T	G	G	A	C	G	T	A	T	G
Bs177	T	G	G	A	C	G	T	A	T	G
Bs254	T	G	G	A	C	G	T	A	T	G
Bs243	C	G	G	G	T	G	C	T	T	T
Bs423	T	A	C	A	T	C	T	A	T	G

Strain	nt position 1207	nt position 1267	Number of SNPs (/1498 aligned nt)
Bs240	T	G	1
Bs251	T	G	1
Bs256	T	G	1
Bs228	T	G	0
H97	T	D	1
Bs262	T	G	6
Bs363	T	G	6
Bs177	T	G	6
Bs254	T	G	6
Bs243	T	T	1
Bs423	G	D	10

When compared with the consensus sequence (composed by the most frequent allele found at each polymorphic nt position), the substituted or deleted nt (D) are framed in color.

Table S4 Nucleotide variability of the sequences orthologous to mitochondrial gene *atp6*

Strain	nt position 167	Number of SNPs (/742 aligned nt)
Bs177	G	1
Bs228	A	0
Bs240	A	0
Bs243	A	0
Bs251	A	0
Bs254	G	1
Bs256	A	0
Bs262	G	1
Bs363	G	1
Bs423	G	1
H97	A	0

When compared with the consensus sequence (composed by the most frequent allele found at each polymorphic nt position), the substituted or deleted (D) nt are framed in color.

Table S5 Nucleotide variability of the sequences orthologous to the inter genic region (*mt-ig*) between the genes *nad6* and *atp6*

Strain	nt position 185	nt position 441	nt position 456	nt position 459	nt position 496	Number of SNPs (/668 aligned nt)
Bs243	T	T	T	T	A	0
Bs251	T	T	T	T	A	0
Bs228	T	T	T	T	A	0
Bs256	T	T	T	T	A	0
Bs240	T	T	T	T	A	0
Bs177	T	A	A	G	T	4
Bs254	T	A	A	G	T	4
Bs262	T	A	A	G	T	4
Bs363	T	A	A	G	T	4
H97	T	T	T	T	A	0
Bs423	A	T	T	T	T	2

When compared with the consensus sequence (composed by the most frequent allele found at each polymorphic nt position), the substituted or deleted nt (D) are framed in color.

Table S6 Nucleotide variability of the sequences orthologous to eroded gene *rpo*

Strain	nt position 126	nt position 625	nt position 626	nt position 658	Number of SNPs (/776 aligned nt)
Bs177	C	G	T	C	0
Bs228	C	G	T	C	0
Bs240	C	G	T	C	0
Bs243	C	G	T	C	0
Bs251	C	G	T	C	0
Bs254	C	G	T	C	0
Bs256	C	G	T	C	0
Bs262	C	G	T	C	0
Bs363	C	G	T	C	0
H97	C	G	T	C	0
Bs423	A	T	A	G	4

When compared with the consensus sequence (composed by the most frequent allele found at each polymorphic nt position), the substituted or deleted (D) nt are framed in color.

Table S7 Nucleotide variability of the nuclear sequence of the ITS1/5.8S/ITS2 region

Strain	nt position 10	nt position 19	nt position 39	nt position 102	nt position 103	nt position 137	nt position 140	nt position 459	nt position 471
Bs177	G/G	A/ G	C/C	T/T	T/T	C/ T	C /T	C/C	A /G
Bs228	G/G	A/A	C/C	T/T	T/T	C/C	T/T	C/C	G/G
Bs240	G/G	A/A	C/ T	T/T	T/T	C/C	T/T	C/ A	G/G
Bs243	G/G	A/A	C/C	T/T	T/T	C/ T	C /T	C/C	G/G
Bs251	G/G	A/A	C/C	T/T	T/T	C/C	T/T	C/C	G/G
Bs254	A /G	A/A	C/C	T/ G	T/T	C/C	T/T	C/C	G/G
Bs256	G/G	A/A	C/C	T/T	T/T	C/C	T/T	C/C	G/G
Bs262	G/G	A/A	C/C	T/T	T/T	C/ T	C /T	C/C	G/G
Bs363	G/G	A/A	C/C	T/T	T/T	C/C	T/T	C/C	G/G
Bs423	G	A	C	T	D	C	T	C	G
H97	G	A	C	T	T	C	D	C	G

Strain	nt position 509	nt position 515	nt position 550	nt position 628	Number of SNPs (/652 aligned nt)
Bs177	C / C	C/ A	C/C	G/G	7
Bs228	T/T	C/C	T /T	G/G	2
Bs240	T/T	C/C	T /T	G/G	4
Bs243	C /T	C/ A	C/C	G/G	4
Bs251	T/T	C/C	T /T	G/G	2
Bs254	C / C	C/C	C/C	G/G	4
Bs256	T/T	C/C	T /T	G/G	2
Bs262	C /T	C/C	C/ T	G/G	4
Bs363	C / C	C/ A	C/C	G/G	3
Bs423	C	C	C	A	3
H97	T	C	T	G	2

When compared with the consensus sequence (composed by the most frequent allele found at each polymorphic nt position), the SNP (substituted or deleted “D” nt) are shown in color.

Table S8 Nucleotide variability of the sequences orthologous to the nuclear gene *rpb2*

Strain	nt position 240	nt position 243	nt position 258	nt position 477	nt position 516	nt position 558	nt position 600	nt position 633	nt position 636	nt position 678	nt position 693
Bs243	T/T	C/C	T/T	C/C	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	T/T	T/T
Bs 256	T/T	C/C	C/T	C/C	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	T/T	T/T
Bs 240	T/T	C/C	T/T	C/C	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	C/T	T/T
Bs 228	T/C	C/C	C/T	C/C	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	T/T	T/T
Bs 177	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	C/T	T/T
Bs 254	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	C/T	T/T
Bs 262	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	C/T	T/T
Bs 363	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	C/T	T/T
Bs 251	C/C	C/C	T/T	C/C	C/C	G/G	A/A	T/T	G/G	C/C	T/T
Bs 423	C	C	T	C	T	G	A	T	G	T	C
H97	C	T	T	T	C	A	G	C	A	T	T

strain	nt position 702	nt position 708	nt position 711	nt position 729	nt position 732	nt position 765	Number of SNPs (/787 aligned nt)
Bs243	A/A	G/G	T/T	G/G	A/A	C/C	6
Bs 256	A/A	G/G	C/T	G/G	A/G	C/C	5
Bs 240	A/A	G/G	C/C	G/G	G/G	C/C	3
Bs 228	A/A	G/G	C/C	G/G	G/G	C/C	2
Bs 177	A/A	A/G	C/C	G/G	G/G	C/C	3
Bs 254	A/A	A/G	C/C	G/G	G/G	C/C	3
Bs 262	A/A	A/G	C/C	G/G	G/G	C/C	3
Bs 363	A/A	A/G	C/C	G/G	G/G	C/C	3
Bs 251	A/A	A/A	C/C	G/G	G/G	C/C	4
Bs 423	A	G	C	A	G	T	4
H97	G	G	C	G	G	C	7

When compared with the consensus sequence (composed by the most frequent allele found at each polymorphic nt position), the substituted or deleted (D) nt are shown in color.

Table S9 Nucleotide variability of the sequences orthologous to nuclear gene *frk*

Strain	nt position 71	nt position 97	nt position 98	nt position 111	nt position 165	nt position 169	nt position 174	nt position 193	nt position 206	nt position 216	nt position 217	nt position 303	nt position 362
Bs 228	C/T	G/G	C/C	C/C	G/G	C/C	A/G	A/C	C/T	A/A	A/A	T/T	C/T
Bs 254	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	C/G	A/G	A/C	C/T	A/G	A/A	T/T	C/T
Bs 177	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	C/C	G/G	C/C	C/C	A/A	A/A	T/T	C/C
Bs 363	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	C/G	A/G	A/C	C/T	A/G	A/A	T/T	C/T
Bs 251	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	A/A	A/A	T/T	A/G	A/A	T/T	C/T
Bs 256	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	A/A	A/A	T/T	A/G	A/A	T/T	C/T
Bs 240	C/T	G/G	C/C	C/C	G/G	C/G	A/A	A/A	T/T	A/G	A/A	T/T	C/T
Bs262	C/C	T/G	C/C	C/C	G/G	C/G	A/G	A/C	C/T	A/G	A/A	T/T	C/T
Bs 243	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	C/G	A/A	A/A	T/T	A/A	A/A	T/T	C/T
Bs 423	C	G	G	C	G	G	G	A	C	A	G	C	C
H97	C	G	C	T	C	G	A	A	T	A	A	T	C

Strain	nt position 390	nt position 400	nt position 417	nt position 460	nt position 567	nt position 582	nt position 586	nt position 598	nt position 601	nt position 603	nt position 604	nt position 610	nt position 654
Bs 228	C/T	C/C	C/T	A/A	A/A	C/T	T/T	C/T	A/G	A/C	A/G	G/G	C/C
Bs 254	C/T	C/C	C/T	A/A	A/G	C/T	T/T	C/T	A/G	C/C	G/G	G/G	C/C
Bs 177	C/C	C/C	C/C	A/A	A/A	T/T	T/T	C/C	A/A	C/C	G/G	G/G	C/C
Bs 363	C/T	C/C	C/T	A/A	A/G	C/T	T/T	C/T	A/G	C/C	G/G	G/G	C/C
Bs 251	T/T	C/C	T/T	A/A	G/G	C/T	T/T	T/T	G/G	C/C	G/G	A/G	C/C
Bs 256	T/T	C/C	T/T	A/A	G/G	C/T	T/T	T/T	G/G	C/C	G/G	A/G	C/C
Bs 240	T/T	C/C	T/T	A/A	G/G	C/C	T/T	T/T	G/G	A/C	A/G	G/G	A/C
Bs262	C/T	C/C	C/T	A/A	A/G	C/T	T/T	C/T	A/G	C/C	G/G	G/G	C/C
Bs 243	T/T	C/C	T/T	A/A	G/G	C/T	T/T	T/T	G/G	A/C	A/G	A/G	C/C
Bs 423	T	T	C	G	G	T	C	T	A	C	G	G	C
H97	T	C	C	A	G	T	T	T	A	C	G	G	C

Strain	nt position 657	nt position 679	nt position 715	nt position 732	nt position 736	nt position 744	Number of SNPs (/750 aligned nt)
Bs 228	C/C	C/T	A/G	T/T	A/G	G/G	19
Bs 254	C/C	C/C	G/G	T/T	G/G	A/G	13
Bs 177	C/C	C/C	G/G	T/T	A/A	G/G	20
Bs 363	C/C	C/C	G/G	T/T	G/G	A/G	13
Bs 251	C/C	C/T	A/G	T/T	G/G	A/G	7
Bs 256	C/C	C/T	A/G	T/T	G/G	A/G	7
Bs 240	C/G	C/T	A/G	T/T	G/G	A/G	13
Bs262	C/C	C/C	G/G	T/T	A/G	A/G	15
Bs 243	G/G	T/T	A/A	T/T	G/G	G/G	12
Bs 423	C	C	G	T	G	G	10
H97	C	C	G	C	G	G	4

When compared with the consensus sequence (composed by the most frequent allele found at each polymorphic nt position), the substituted or deleted (D) nt are shown in color.

Chapitre 3:

**Caractérisation de souches d'*Agaricus bisporus* à l'aide
de marqueurs génotypiques en vue du suivi de leur
comportement biologique dans leur milieu naturel ou
en chambre de culture**

I- Introduction

Comme indiqué au chapitre 1, neuf souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* ont été sélectionnées dans la mycothèque CGAB du laboratoire, sur la base des caractères phénotypiques et génotypiques décrits pour chaque souche dans la base de données attachée à la mycothèque.

Dans ce chapitre, les caractéristiques phénotypiques telles que la couleur du sporocarpe et le rendement de fructification de ces neuf souches ont été vérifiées expérimentalement en chambre de culture afin de sélectionner les souches sauvages d'intérêt pour l'implantation dans les parcelles expérimentales.

L'analyse des séquences nucléaires et mitochondriales établies dans chapitre 2, a permis de définir des marqueurs moléculaires (de type CAPS et/ou RFLP) utilisables pour suivre le comportement de souches sauvages sélectionnées, lors de leur introduction dans un environnement naturel (parcelle expérimentale de cyprès) ou lors de simulations des conditions d'implantation réalisées dans une chambre de culture. De plus, les nombreux hétéromorphismes, détectés dans les séquences nucléaires des souches sauvages hétérocaryotiques, ont permis de caractériser les formes alléliques portées par les six noyaux des trois souches principales de l'étude. Ces formes alléliques ont, en effet, été séparées après clonage moléculaire dans l'eubactérie *E. coli*. Elles permettront de mieux comprendre les mécanismes de reproduction de ce champignon à l'œuvre dans la structuration et l'évolution spatio-temporelle des populations dans leur milieu naturel.

II- Matériels et Protocoles expérimentaux

II-1– Estimation quantitative du rendement de fructification

Un essai entièrement randomisé avec trois répétitions a été réalisé afin d'évaluer le rendement des neuf souches présélectionnées. Le « cultivar » Horst U1 (Unité de recherche sur les champignons, Horst, Pays-Bas) a été utilisé comme souche contrôle. Le protocole de fructification mis en œuvre est décrit ci-dessous.

II-1-1- Préparation de la semence « blanc » sur des grains de blé

Les souches sélectionnées ont été retirées de l'azote liquide où elles étaient conservées sur des fragments de milieu solide dans la mycothèque du laboratoire. Elles ont été repiquées dans des boîtes de Petri (diamètre 90 mm) sur un milieu CYM (Raper et al. 1972) solide supplémenté avec de l'extrait de compost (Phase II) commercial. Les mycéliums ont alors été cultivés pendant 14 jours à 25 ° C.

Une demi-boîte de milieu solide envahi par la colonie mycélienne a été utilisée pour ensemercer un sac contenant 200 g de grains de blé (préalablement autoclavés à 121 ° C pendant 20 min). Les sacs sont alors incubés pendant 25 jours à 25°C afin de permettre l'envahissement complet des grains par le mycélium.

II-1-2- Protocole d'obtention des fructifications en chambre de culture

Pour chaque souche, trois sacs contenant 5 kg de compost (production commerciale, ACECR, Iran) ont été inoculés chacun avec 50 g de « blanc » (grains de blé envahis par les filaments mycéliens). La chambre de culture est équipée d'un système permettant la régulation de la température et de l'humidité de l'air. Après 18 jours d'incubation (25 °C, 85 % d'humidité), le mycélium a envahi le compost. La fructification est alors induite par dépôt d'une couche de terre

a.



b.



c.



d.



Figure 3-1- Différentes étapes de la préparation de la semence ou « blanc » et de la mise en fructification des souches en chambre de culture: Sacs de grains envahis par le mycélium = « blanc » (a); Sacs de compost inoculés par le « blanc » (b); ajout de la terre de gobetage (c); obtention des initiations fructifères ou primordia (d)

de gobetage (sol commercial, Erouveen, Pays-Bas) et la température diminuée progressivement à 17 ° C. Les premiers primordia apparaissent alors au bout d'environ 10 jours de culture à 17°C. Des photographies montrant les étapes clés du protocole de fructification sont rassemblées dans la figure 3-1. Les sporocarpes différenciés pendant les 45 jours après l'apparition des premiers primordia (correspondant à deux volées successives) sont récoltés juste avant l'exposition de l'hyménium (ouverture du chapeau). Le poids de l'ensemble des sporophores récoltés est alors déterminé pour calculer le rendement de fructification: [poids frais (en g) des sporocarpes/ 5000 (poids du compost en g)] x 100.

II-1-3- Analyse statistique

La comparaison des valeurs de rendement de fructification obtenues pour chaque souche (3 répétitions) a été réalisée par une analyse de variance utilisant le modèle général linéaire du logiciel Minitab 16.1.1 (www.minitab.com).

La comparaison des moyennes obtenues pour chaque souche a été soumise à une analyse statistique en utilisant le test de Tukey, avec un indice de confiance de 95%.

II-2- Clonage moléculaire des produits de PCR dans bactérie *Escherichia coli*

II-2-1- Préparation de bactéries *E. coli* XL1-blue chimio-compétentes

Le protocole utilisé est celui décrit par Hanahan (1983). Les bactéries de la souche *E. coli* XL1-blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]) (Bullock et al. 1987) ont été cultivées dans du milieu LB liquide (10 g Bactopeptone, 15 g d'extrait de levure, 5 g de NaCl dans 1 litre d'H₂O). 250 µl d'une pré-culture en phase stationnaire (16h, 37°C, avec agitation) servent àensemencer 25 ml de milieu LB liquide contenant 25 µg / ml de tétracycline. Les cellules sont cultivées à 37 ° C avec agitation (250 rpm) jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 0,6 (phase exponentielle de croissance), les cellules sont

alors récupérées par centrifugation (2700 g, 4 ° C, 15 min). Les culots sont alors remis en suspension dans 16 ml de tampon RF1 (RbCl 10mM, MnCl₂ 4 H₂O 45 mM, Acétate de K 30 mM, CaCl₂ 2H₂O 10 mM, 15% glycérol (v/v), pH = 5,8) stérilisé par filtration sur un filtre Millipore 0.45µ et conservé à 4 ° C. Après deux heures d'incubation à 4°C, la culture bactérienne est centrifugée (2700 g, 4 ° C, 15 min). Le culot est remis en suspension dans 5 ml de tampon RF2 (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 2H₂O 75 mM, 15% glycerol (p/v), pH = 6,8) stérilisé par filtration sur filtre Millipore 0.45 µ.

II-2-2- Transformation des bactéries chimio-compétentes

Les produits de PCR sont introduits dans un plasmide vecteur pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, USA) selon les instructions du fabricant (Promega, Madison, WI, USA) en utilisant l'ADN ligase du bactériophage T4. Les réactions sont réalisées pendant une nuit à température ambiante. La transformation a été réalisée comme suit: 2 µl du mélange de ligation ont été mélangés avec 100 µl de bactéries chimio-compétentes et l'ensemble est incubé à 4°C pendant 30 min, puis soumis à un choc thermique à 42 ° C pendant 90 s puis refroidi brutalement dans de la glace (4°C). Un ml de milieu LB liquide est alors ajouté et l'ensemble est incubé à 37°C pendant 30 min. 100 µl sont alors étalés sur du milieu LB solide contenant 50 µg / ml d'ampicilline. Après une nuit d'incubation à 37°C, les colonies bactériennes blanches sont transférées individuellement dans 5 ml de milieu LB liquide contenant 50 µg / ml d'ampicilline et incubées à 37°C avec agitation pendant 16 heures.

II-3- Définition de marqueurs nucléaires de type CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)

Les endonucléases de restriction utilisées pour digérer les produits d'amplification ont été déduites de l'analyse des mutations SNP mises en évidence dans les séquences établies au chapitre 2 à partir des souches hétérocaryotiques. Les profils de digestion par des endonucléases de restriction ont été établis à partir des séquences sélectionnées à l'aide du logiciel Algosome, disponible sur le site <http://www.algosome.com/resources/restriction-map/enzyme-digest.php>. Les tailles des fragments de restriction générés sur les produits d'amplification ont ensuite été vérifiées expérimentalement après électrophorèse dans un gel d'agarose.

III- Résultats

III-1- Sélection des souches sauvages à introduire dans les parcelles

Avant leur introduction dans les parcelles, les neuf souches sauvages françaises issues du premier tour de sélection sur la base de critères morphologiques et génétiques (cf. chapitre 1), ont été placées dans des conditions de culture puis de fructification en chambre de façon à vérifier et comparer leur rendement de fructification. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque souche. Une souche industrielle (cultivar Horst U1) a été ajoutée à l'expérience ainsi que la souche française Bs423 représentant la variété homothallique haploïde *A. bisporus* var. *eurotetrasporus*.

Pour chaque souche et chacune des trois répétitions, les sporocarpes différenciés pendant les 45 jours suivant l'apparition des premiers primordia (correspondant à deux volées successives) sont récoltés juste avant l'exposition de l'hyménium (ouverture du chapeau).

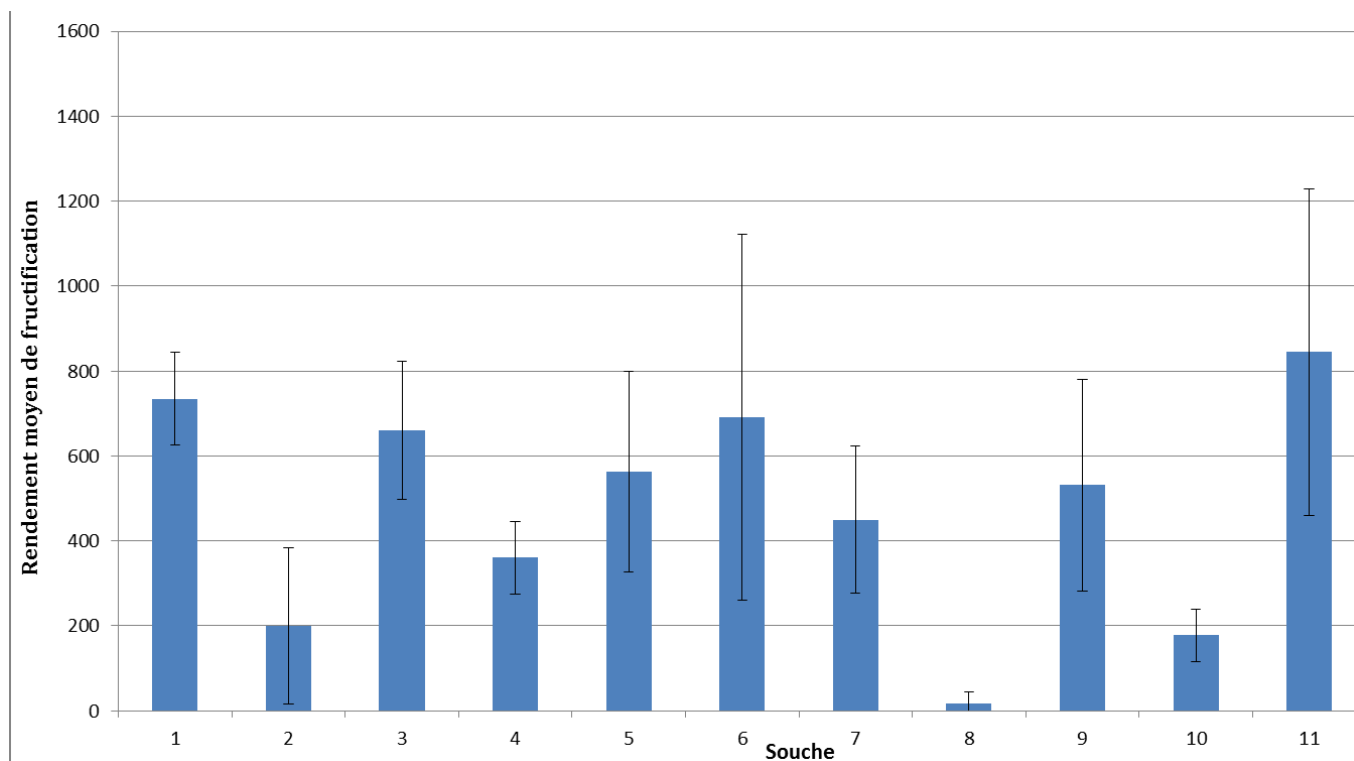


Figure 3-2- Moyenne des rendements de fructification obtenus au cours des trois répétitions pour les 11 souches d'*A. bisporus* ; 1: Bs177, 2: Bs228, 3: Bs240, 4: Bs243, 5: Bs251, 6: Bs254, 7: Bs256, 8: Bs262, 9: Bs363, 10: Bs423, 11: U1

Tableau 3-1- Comparaison multiple des moyennes de rendement de fructification à l'aide du test statistique de Tukey (avec un indice de confiance de 95,0 %)

Souche	Répète	Moyenne	Groupe			
Bs177	3	734.2	A*			
Bs254	3	706.1	A	B		
U1	3	648.4	A	B	C	
Bs363	3	626.0	A	B	C	
Bs240	3	599.5	A	B	C	
Bs256	3	514.6		B	C	D
Bs251	3	474.7			C	D
Bs243	3	360.4				D E
Bs423	3	177.3				E F
Bs228	3	129.2				F
Bs262	3	16.7				F

* les Moyennes qui ne partagent pas une lettre sont significativement différentes les unes des autres

Le poids de l'ensemble des sporophores récoltés est alors déterminé pour calculer le rendement de fructification : [poids frais (en g) des sporocarpes/ 5000 (poids du compost en g)] x 100.

La moyenne des rendements de fructification obtenus avec chacune des souches ainsi que les écart-types sont indiqué sur la figure 3-2.

Comme le montre le tableau 3-1, parmi les souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* présélectionnées, six souches ont montré des rendements de fructification élevés : Bs177, Bs254, Bs363, Bs240, Bs256 et Bs251. De plus, l'analyse statistique a montré que leur rendement de fructification n'étaient pas significativement différents de celui du cultivar de référence Horst U1.

Cependant, il faut noter que la souche Bs363 bien que montrant un rendement de fructification élevé, produit majoritairement des gros sporocarpes incapables de déchirer le voile secondaire protégeant l'hyménium et donc de s'ouvrir à maturité pour libérer les basidiospores. Cette souche a donc été retirée de la sélection.

De plus, la souche Bs243, de rendement statistiquement identique à Bs251 (cf. tableau 3-1) possédaient des sporocarpes dont la couleur blanc crème était aisément distinguable de celles des autres souches à bon rendement qui possédaient des sporocarpes de couleur brune plus ou moins profonde (Fig. 3-3). En conséquence cette souche Bs243 a été retenue au lieu de la souche Bs251.

Les souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* Bs228 et Bs262 présentaient des rendements de fructification faibles et ont été éliminées.

Il faut cependant noter que la seule souche homothallique haploïde de l'étude Bs423 (*A. bisporus* var. *eurotetrasporus*) présente elle aussi des rendements de fructification faibles en comparaison avec la majorité des autres souches de la var. *bisporus*.

Les comparaisons de séquences nucléaires et mitochondriales décrites dans le chapitre 2 et publiées par Jalalzadeh et al. (2014) ont montré que, parmi les 5 souches françaises d'*A.*



Figure 3-3- Comparaison d'un sporocarpe de couleur crème de la souche Bs243 et d'un sporocarpe de couleur brune de la souche Bs363

Tableau 3-2- variabilité nucléotidique de la région de l'unité ribosomique ITS1/5.8S/ITS2

Souche	nt position 10	nt position 19	nt position 39	nt position 102	nt position 137	nt position 140	nt position 459	nt position 471
Bs177	G/G	A/G	C/C	T/T	C/T	C/T	C/C	A/G
Bs228	G/G	A/A	C/C	T/T	C/C	T/T	C/C	G/G
Bs240	G/G	A/A	C/T	T/T	C/C	T/T	C/A	G/G
Bs243	G/G	A/A	C/C	T/T	C/T	C/T	C/C	G/G
Bs251	G/G	A/A	C/C	T/T	C/C	T/T	C/C	G/G
Bs254	A/G	A/A	C/C	T/G	C/C	T/T	C/C	G/G
Bs256	G/G	A/A	C/C	T/T	C/C	T/T	C/C	G/G
Bs262	G/G	A/A	C/C	T/T	C/T	C/T	C/C	G/G
Bs363	G/G	A/A	C/C	T/T	C/C	T/T	C/C	G/G

Souche	nt position 509	nt position 515	nt position 550
Bs177	C/C	C/A	C/C
Bs228	T/T	C/C	T/T
Bs240	T/T	C/C	T/T
Bs243	C/T	C/A	C/C
Bs251	T/T	C/C	T/T
Bs254	C/C	C/C	C/C
Bs256	T/T	C/C	T/T
Bs262	C/T	C/C	C/T
Bs363	C/C	C/A	C/C

Tableau 3-3- variabilité nucléotidique de la région amplifiée du gène *frk*

Souche	nt position 71	nt position 97	nt position 169	nt position 174	nt position 193	nt position 206	nt position 216	nt position 390	nt position 417	nt position 567	nt position 582
Bs 228	C/T	G/G	C/C	A/G	A/C	C/T	A/A	C/T	C/T	A/A	C/T
Bs 254	C/C	G/G	C/G	A/G	A/C	C/T	A/G	C/T	C/T	A/G	C/T
Bs 177	C/C	G/G	C/C	G/G	C/C	C/C	A/A	C/C	C/C	A/A	T/T
Bs 363	C/C	G/G	C/G	A/G	A/C	C/T	A/G	C/T	C/T	A/G	C/T
Bs 251	C/C	G/G	G/G	A/A	A/A	T/T	A/G	T/T	T/T	G/G	C/T
Bs 256	C/C	G/G	G/G	A/A	A/A	T/T	A/G	T/T	T/T	G/G	C/T
Bs 240	C/T	G/G	C/G	A/A	A/A	T/T	A/G	T/T	T/T	G/G	C/C
Bs262	C/C	T/G	C/G	A/G	A/C	C/T	A/G	C/T	C/T	A/G	C/T
Bs 243	C/C	G/G	C/G	A/A	A/A	T/T	A/A	T/T	T/T	G/G	C/T

Souche	nt position 598	nt position 601	nt position 603	nt position 604	nt position 610	nt position 654	nt position 657	nt position 679	nt position 715	nt position 736	nt position 744
Bs 228	C/T	A/G	A/C	A/G	G/G	C/C	C/C	C/T	A/G	A/G	G/G
Bs 254	C/T	A/G	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	A/G
Bs 177	C/C	A/A	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	A/A	G/G
Bs 363	C/T	A/G	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	A/G
Bs 251	T/T	G/G	C/C	G/G	A/G	C/C	C/C	C/T	A/G	G/G	A/G
Bs 256	T/T	G/G	C/C	G/G	A/G	C/C	C/C	C/T	A/G	G/G	A/G
Bs 240	T/T	G/G	A/C	A/G	G/G	A/C	C/G	C/T	A/G	G/G	A/G
Bs262	C/T	A/G	C/C	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	A/G	A/G
Bs 243	T/T	G/G	A/C	A/G	A/G	C/C	G/G	T/T	A/A	G/G	G/G

bisporus var. *bisporus* sélectionnées ci-dessus selon leur rendement de fructification en chambre de culture, trois haplotypes mitochondriaux pouvaient être facilement distingués par PCR à l'aide d'amorces ciblant les introns *iAbi10* et *iAbi11*. En effet, les souches Bs 240 et Bs256 possédaient l'intron *iAbi10* et un intron *iAbi11* hébergeant un ORF mobile, les souches Bs177 et Bs254 possédaient, à la place d'*iAbi10*, l'intron *iAbi9'* et un intron *iAbi11* sans ORF mobile, la souche Bs243 possédait un haplotype mitochondrial unique sans intron *iAbi10*, *iAbi9'* et *iAbi11*. La souche d'*A. bisporus* var. *eurotetrasporus* Bs423 elle aussi possédait un haplotype unique associant *iAbi9'* et *iAbi11* + ORF mobile.

L'analyse des séquences nucléaires constituées par la région de l'unité ribosomique ITS1/5,8S/ITS2 d'une part, et la région 5' du gène *frk* d'autre part, de ces cinq souches a montré des taux de substitutions nucléotidiques (SNP) élevés permettant de distinguer sans ambiguïté chacune des 5 souches. De plus, ces deux marqueurs montrent de nombreux hétéromorphismes permettant de distinguer les deux noyaux portés par ces différentes souches hétérocaryotiques (Tableau 3-2 et 3-3).

Nous avons donc sélectionné trois souches porteuses d'haplotypes mitochondriaux différents, aisément distinguables par le couple d'amorce ciblant *iAbi11*: Bs177 (Mt Haplotype S caractérisé par un intron *iAbi11* dépourvu d'ORF mobile: 987 bp), Bs256 (Mt Haplotype L caractérisé par un intron *iAbi11* avec ORF mobile 2 230 bp) et Bs243 (Mt Haplotype 0 caractérisé par l'absence d'intron *iAbi11*: pas de produit d'amplification). Ces souches hétérocaryotiques, qui constitueront, après leur introduction, le matériel biologique de l'expérimentation principale sur les parcelles de cyprès, ont été utilisées pour déterminer le génotype de chacun des noyaux qu'elles hébergent.

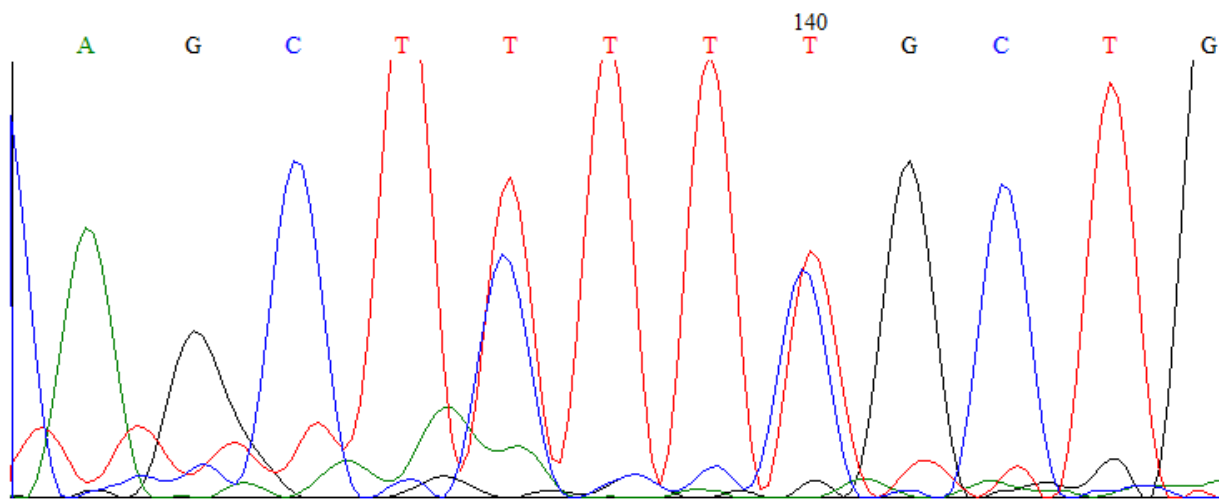


Figure 3-4- Hétéromorphismes dans les séquences obtenues par séquençage des amplifiats du marqueur ITS chez la souche Bs243 en positions nt 137 et nt 140

III-2- Définition du génotype de chaque noyau porté par les trois souches hétérocaryotiques d'*A. bisporus* Bs177, Bs243 et Bs256

En accord avec leur nature hétérocaryotique, ces trois souches étaient porteuses de nombreux hétéromorphismes au niveau des séquences nucléaires de l'unité ribosomique et du gène *frk*. Nous avons donc décidé d'établir la séquence des six allèles portés par les six noyaux des trois souches, pour d'une part la région de l'unité ribosomique (ITS) et d'autre part la région 5' du gène *frk*, par une approche de séparation des formes alléliques après clonage moléculaire chez *E. coli*. En effet, en accord avec la nature hétérocaryotique des souches, les deux allèles sont supposés présents en quantité équimoléculaire dans l'ADN extrait et donc également représentés dans le produit d'amplification. Ceci est d'ailleurs confirmé par la présence des hétéromorphismes dans les séquences obtenues par séquençage direct des amplifiats (Fig. 3-4).

Ainsi, pour chaque locus (ITS et *frk*), les produits d'amplification obtenus pour chacune des trois souches d'*A. bisporus* ont été clonés dans *E. coli* XL1-blue, à l'aide du plasmide vecteur pGEM-T-easy (Promega). Pour chaque transformation, un grand nombre de clones (>100) a été obtenu. Pour chaque locus et chaque souche, quatre plasmides recombinants entre le vecteur et un produit de PCR ont été séquencés. Ceci a permis de déterminer pour chaque locus et chaque souche, les séquences des 2 allèles présents (Fig. S1 et Fig. S2). Ces séquences ont été nommées : *its1*, *its2* pour les deux allèles des unités ribosomiques de la souche Bs177, *its3* et *its4* pour les deux allèles de la souche Bs243 et *its5* pour les deux allèles identiques de Bs256. De même, les allèles du gène *frk* ont été nommés : *frk1* pour les deux allèles identiques de la souche Bs177, *frk2* et *frk3* pour les deux allèles de la souche Bs243, *frk4* et *frk5* pour ceux de Bs256.

En parallèle, avec la détermination des séquences alléliques des marqueurs ITS et *frk* de chaque noyau des souches Bs177, Bs243 et Bs256, nous avons développé des marqueurs

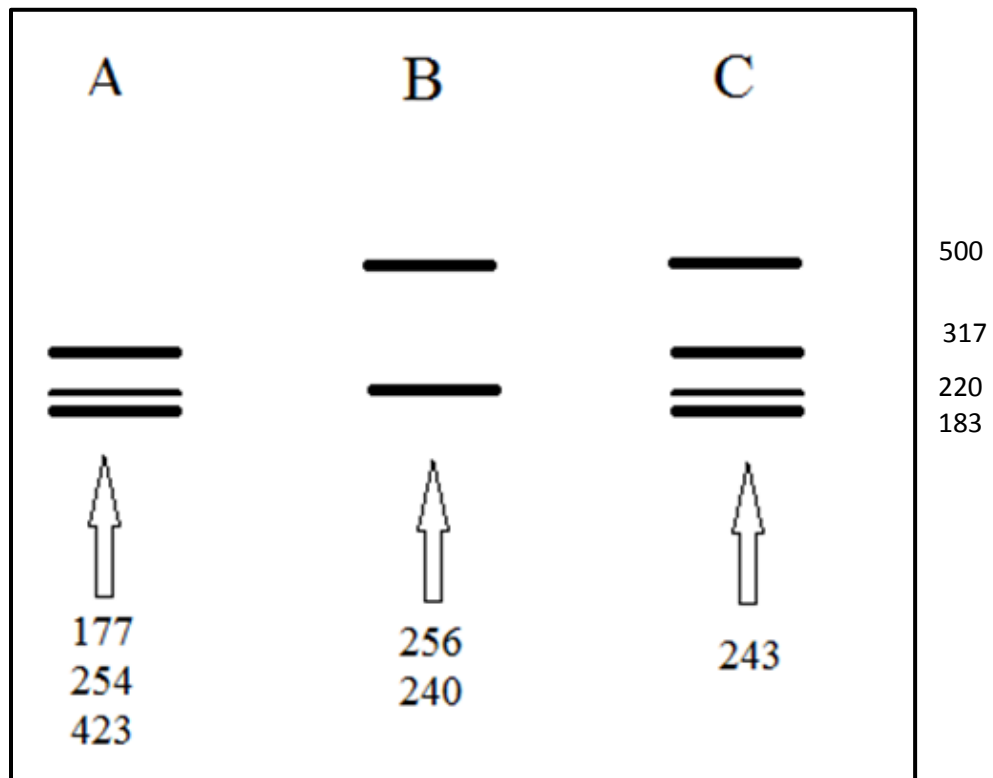


Figure 3-5- Représentation schématique du profil électrophorétique du produit de PCR ITS de différentes souches, après digestion enzymatique par endonucléase de restriction *Hae*III

permettant de caractériser rapidement et aisément ces souches à partir d'ADN extrait de mycélia ou de sporocarpes.

Les marqueurs nucléaires de type CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) développés sont basés sur les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) des séquences établies dans le chapitre 2. Le développement de ces marqueurs a été réalisé à partir des séquences des cinq souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* précédemment retenues: Bs177, Bs240, Bs 243, Bs 254 et Bs256 et de la séquence de la souche d'*A. bisporus* var. *eurotetrasporus* Bs423.

Ainsi, le polymorphisme (SNP) des séquences de l'unité ribosomique de ces six souches se traduit, selon les souches, par la présence/absence de sites de restriction 5'GG/CC3' reconnus par l'endonuclease *HaeIII*. En conséquence, les fragments de restriction générés sur les produits d'amplification auront des tailles différentes distinguables par électrophorèse dans un gel d'agarose. Le profil de digestion du produit de PCR (ITS 4/ITS5) des six souches, après digestion enzymatique par *HaeIII* est illustré dans la figure 3-5. Le profil A concerne les souches Bs177, Bs254 et Bs423, le profil B correspond aux souches Bs256 et Bs240 et le profil C celui de la souche Bs243.

De façon similaire, un second marqueur CAPS a été développé à partir des séquences amplifiées du gène *frk*. Comme pour le marqueur ITS ci-dessus, les fragments de restriction par *HaeIII* des produits de PCR du locus *frk* se sont révélés de tailles variables selon les souches. Les profils obtenus avec les six souches de l'étude sont représentés dans la figure 3-6. Le profil D concerne les souches Bs177 et Bs423, le profil E correspond à la souche Bs240 et le profil F à celui des souches Bs243, Bs254 et Bs 256.

La combinaison des marqueurs CAPS ITS et *frk* permet de distinguer cinq des six souches de l'étude ; Bs254 (profils A+F), Bs 256 (profils B+F), Bs 240 (profils B+E), Bs243 (profils C+F), Bs177 et Bs 423 (profils A + D). Il faut noter que ces deux dernières souches sont facilement distinguables par leur haplotype mitochondrial différent.

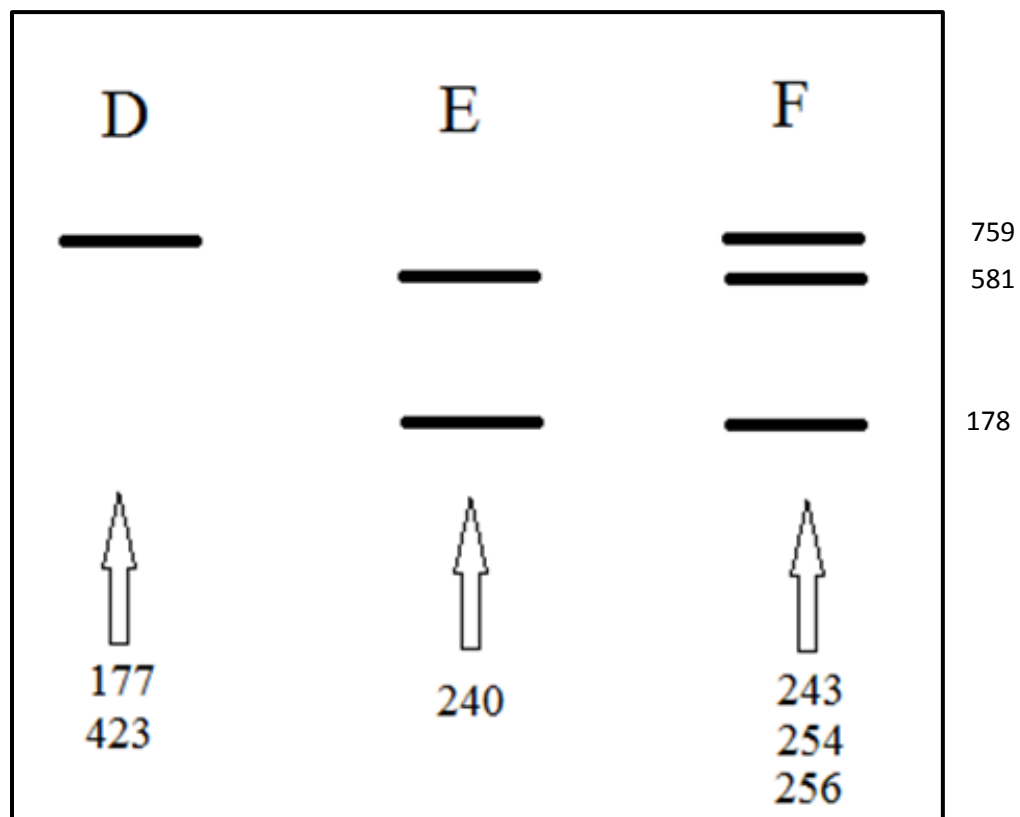


Figure 3-6- Représentation schématique du profil électrophorétique du produit de PCR de la région 5' du gène *frk* de différentes souches, après digestion enzymatique par endonucléase de restriction *HaeIII*

Chapitre 4: Etude de l'exposition de mycelia hétérocaryotiques d'*Agaricus bisporus* var. *bisporus* à un nuage de basidiospores

Publication en cours de finalisation avant soumission

**In *Agaricus bisporus* var. *bisporus*, exposure of heterocaryotic mycelia
to a cloud of basidiospores promotes hybrids generated by a Buller
phenomenon depending on the recipient mycelium**

In *Agaricus bisporus* var. *bisporus* wild strains, exposure of heterokaryotic mycelia to a cloud of basidiospores promotes hybrid formation by a Buller phenomenon depending on the recipient mycelium

Abstract Analysis of wild populations of *A. bisporus* is mainly based on the analysis of sporocarps taken from the wild. However, it is conceivable that different forms such as heterokaryotic mycelia, homokaryotic and/or heterokaryotic spores, and even homokaryotic mycelia issued from the germination of spores are simultaneously present in the natural environment. These forms are difficult to isolate and characterize, but can potentially play important roles in structure and evolution of wild populations. Accordingly, we designed an experiment under “field-like” conditions in which a heterokaryotic mycelia of an *A. bisporus* var. *bisporus* wild strain, having previously invaded compost and designed as Recipient mycelia (Rm), were exposed to a cloud of basidiospores from sporocarps of another *A. bisporus* var. *bisporus* wild strain designed as the Donor of basidiospores (Db). Genotypic analysis of sporocarps produced on Rm cultures was carried out for two combinations (Db 243/Rm 177 and Db 243/Rm 256) involving Rm from two different wild strains exposed to the same cloud of basidiospores. In combination Db 243/Rm 177, all the analyzed sporophores resulted from fruiting of the heterokaryotic mycelium of strain Bs177 inoculated in the compost. On the contrary, in the other combination (Db 243/Rm 256) involving the same cloud of basidiospores but a different heterokaryotic Rm, the majority (80%) of analyzed sporocarps possessed a hybrid genotype composed by the mitochondrial haplotype of Rm, one nucleus from this Rm heterokaryotic mycelium and one nucleus from the Db strain. Thus these sporocarps were assumed to be differentiated by hybrid mycelia generated by a Buller phenomenon involving the implanted heterokaryotic mycelium and a homokaryotic or heterokaryotic basidiospore or mycelium that grew from it. Interestingly, both nuclei of the Db strain were equally distributed among hybrids while only one nucleus of Rm was found in all the hybrids.

Key words: Buller phenomenon, outcrossing, heteromorphisms, CAPS marker

Introduction

The estimation of the role played in evolution of wild populations by the different modes of reproduction reported in *Agaricus bisporus* species, from genetic analysis of harvested sporocarps, appears difficult because of specific limitations. One obstacle is its complicated life cycle. Another limitation is that occurrence of *A. bisporus* sporocarps in the wild is unpredictable and only occasionally encountered (Kerrigan, 1993a).

According to the predominantly pseudohomothallic life cycle reported in *A. bisporus* var. *bisporus*, in which only a small proportion of the offspring is homokaryotic and self-sterile, outcrossing seems limited and, consequently infrequent in wild populations. In accordance, Kerrigan (1990) found some evidence of pseudoclonal lineages resulting of successive pseudohomothallic generations, in North American populations. However, Xu et al (2002) found that outcrossing events were quite frequent when they studied European populations. In this context, a demonstration of outcrossing between selected strains under « field-like » conditions would permit the reassessment of outcrossing potentials in this species.

In fungi, two main ways of outcrossing have been described: (i) a mating involving two compatible homokaryotic mycelia or spores and (ii) a mating between a homokaryon and a heterokaryon (Buller, 1931). This latter process is called “Buller phenomenon”. During this later process, anastomosis between a homokaryon and a heterokaryon produces a hybrid heterokaryon that receives the nucleus of the homokaryon and one of the two nuclei of the heterokaryon, which must be compatible (Buller 1931). It was first reported in *A. bisporus* by Raper et al. (1972).

In an experiment by Callac et al. (2006), a standard substrate (compost) for *A. bisporus* cultivation was inoculated simultaneously with a homokaryotic mycelium from one parental strain and spores from a second parental strain. In this case of “multispore culture”, the produced heterokaryons can result from matings involving two compatible homokaryons (issued from a single or from both parental strains) or involving a homokaryon and a heterokaryon. Genotype analyses

showed that most of the sporophores resulted from outcrossing between the inoculated homokaryotic mycelium and a heterokaryotic spore (or mycelium that grew from it), via the Buller phenomenon. In these experiments, the complete absence of sporophore directly issued from a germinating heterokaryotic spore was unexpected. This suggests that the Buller phenomenon could play an important role in nature, and explain a part of the outcrossing observed in wild populations. However, it is to be noted that the experiment was restricted to a «special» situation that probably does not frequently occur in the wild. Indeed, to date, presence of homokaryotic mycelium of *A. bisporus* var. *bisporus* has never been reported in the wild.

For this, we decided to study the occurrence of outbreeding (via the Buller phenomenon) between a preinstalled heterokaryotic mycelium from a wild strain and basidiospores produced by mature sporocarps from another heterokaryotic wild strain. The released cloud of basidiospores is mainly composed of bi-nucleate (heterokaryotic) spores but also contains a little but significant number (around 10 %) of uni-nucleate spores (Imbernon et al. 1996; Callac et al. 1996). For this purpose, an experiment was conducted in a culture room which allowed confrontation of a cloud of basidiospores produced by mature sporocarps differentiated by a heterokaryotic strain, designed as the Donor of basidiospores (Db) strain with the mycelia of two other heterokaryotic strains, grown in compost and designed as the Recipient mycelia (Rm).

Materials and methods

Strains, media and culture conditions

The three strains of *A. bisporus* var. *bisporus* Bs177, Bs243 and Bs256, used in this study, were issued from subcultures of mycelia isolated from sporocarps collected in the wild, from two French populations located in Lorient (Bs177 and Bs243) and Saint-Malo (Bs256) and previously studied by Xu et al. (1997; 1998; 2002). According to the *A. bisporus* var. *bisporus* biological

cycle, these cultured mycelia were assumed to be heterokaryotic mycelia, each carrying two types of parental haploid nuclei (Raper et al. 1972), and accordingly, two copies (alleles) of each nuclear sequence. Strains were preserved in liquid nitrogen in the “Collection du Germoplasme des Agarics à Bordeaux” (CGAB). Each strain was cultured in Petri dishes (90 mm diameter) containing CYM solid medium (Raper et al. 1972) supplemented with 0.1 % of compost (phase II) extract during 14 days at 25°C.

For each strain, boxes of spawns were prepared by inoculating wheat grains (160 g of grains previously autoclaved at 121°C for 20 min) by mycelial colonies from two Petri dishes, followed by incubation during 25 days at 25°C. Using these spawn inocula, two successive cultures were performed in compost. The first cultures were destined to produce mature sporocarps able to generate a cloud of basidiospores. They will be named Db for donor of basidiospores. The second cultures, delayed (i. e. inoculations with spawn were realized 20 days after the inoculation of the Db cultures), were destined to obtain heterokaryotic mycelia (named Rm) able to act as recipient for the clouds of basidiospores produced by the Db cultures.

For Donor of basidiospores (strain Bs243), cultures were obtained by inoculating six trays (48×22×20) containing 8 kg of compost (commercial production, Renaud Society, France) with 80 g of spawn. In the same way, for preparing the recipient mycelia (Rm cultures) of each strain (Bs177 and Bs256), 4 trays (60×40×14), containing 10 kg of compost were inoculated with 100 g of spawn.

After 17 days of incubation at 25 °C of the Db cultures in a climate room (N°1), mycelia covered most of the compost surface and fructification was induced by addition of a casing layer on the compost (mixing sand, peat and limestone in 1/1/1 (v/v/v) proportions, previously autoclaved at 121°C for one hour). Then (10 days after), trays were transferred to another climate room (N°2) in which culture temperature was decreased to 17°C. This led to the differentiation of

sporocarps. 26 days after the addition of the casing layer, several sporocarps (>10) reached a stage near their opening and exposure of the hymenial chamber.

At that time, trays containing recipient mycelium cultures (Rm) were transferred from climate room N°1 to the climate room N°2 and placed adjacent to sporocarps of the Db Bs243 cultures. Precisely, three trays of Db cultures were placed adjacent to two trays of Rm cultures (Fig. 1) in the two following combinations: 3(Db Bs243) x 2(Rm Bs177) and 3(Db Bs243) x 2(Rm Bs256). To avoid the dissemination of basidiopores in the climate room N°2, each combination was isolated from the other one in a closed plastic compartment before opening of the differentiated basidiocarps of the Db cultures (Fig. 1). In each compartment, a fan was installed to push the cloud of basidiospores produced by the sporocarps of the Db cultures toward the recipient mycelia (Rm) cultures. After one week of spore clouds dissemination, Db cultures were removed and Rm cultures were recovered by a casing layer to induce fructification. About 14 days after addition of the casing layer, differentiated fruiting bodies (25 per tray, corresponding to 50 per experimental combination) were collected.

In order to check for effective contacts between recipient mycelia and basidiospore clouds, an adhesive strip was installed along the surface of each recipient tray to act as a trap for the basidiospores. Presence of spores on the adhesive strips was verified by light microscopy.

DNA extraction, PCR amplification and Molecular cloning of PCR products in *Escherichia coli*

Extraction of genomic DNA from 0.2g of a lyophilized sporocarp was performed by the “miniprep” CTAB method (Barroso et al. 1995). Two nuclear CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) markers and one mitochondrial marker were used to establish the genotype of the analyzed sporocarps. PCR reactions were performed using GoTaq® DNA polymerase, according to the supplier’s recommendation (Promega, Madison, WI, USA) with

primers ITS4/ITS5 (White et al. 1990) for the ITS ribosomal region or PR6U/ PR6R (Imbernon et al. 1996) for the 5' region of the *frk* gene. Amplification algorithm was as follows: 95 ° C for 5 min, 35 cycles × [95 ° C for 30 s, 54°C (ITS4/ITS5) or 58°C (PR6U/PR6R) for 30 s, 72 ° C for 1 min], 72 ° C for 5 min. PCR amplification of the mitochondrial *iAbi11* sequence was achieved using i11U/i11R primers (Jalalzadeh et al. 2014) as follows: 95 ° C for 5 min, 35 cycles × [95 ° C for 30 s, 50 ° C for 30 s, 72 ° C for 3 min], 72 ° C for 5 min. PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis after digestion by the restriction endonuclease *HaeIII* (ITS region and *frk* gene) or not (mitochondrial sequence *iAbi11*) and, when required, sequenced by Cogenics - Genome Express (Grenoble - France). Multiple sequence alignments were conducted with the help of CLUSTALW (Thompson et al. 1994). To design CAPs markers, nuclear sequences were analyzed with the help of Algosome program.

PCR products were cloned in *E. coli* XL1-blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]) (Bullock et al. 1987), with the help of the plasmid vector pGEM-T-easy (Promega, Madison, WI, USA), according to the supplier's recommendation. Chimio-competent bacteria were obtained as described by Hanahan (1983). Sequence of primers, sequence allelic forms and CAPS allelic forms for each of the ITS and *frk* region are indicated in table 1.

Results

Development of two nuclear markers allowing discrimination of the alleles carried by the six nuclei of the three *A. bisporus* var. *bisporus* studied strains

The total DNA of the three strains (Bs177, Bs234 and Bs256) used in the Db and Rm cultures were extracted. In a previous study (Jalalzadeh et al. 2014), we have shown that the sequences of two nuclear markers (the ITS region of the ribosomal unit and the 5' region of the *frk* gene) were

highly polymorphic between these strains. Moreover, these sequences carried several heteromorphisms that can, putatively be used to distinguish both nuclei of each heterokaryotic strain.

To separate the allelic forms of each strain, the ITS and *frk* amplified products were independently cloned in *E. coli* and, for each marker, inserts carried by four different recombinant plasmids were sequenced. For each strain and marker, the sequences of both allelic forms were compared and analyzed to find polymorphic restriction sites and develop CAPS markers. The *Hae*III restriction map of the six alleles of the ITS and *frk* regions carried by the six nuclei of the three strains are shown in figure 2a and 2b, respectively. From this, it can be seen that an analysis of the *Hae*III restriction profiles of both CAPS marker ITS and *frk* allows to distinguish the three studied heterokaryotic strains of this study (Fig. 3).

Differentiation of sporocarps produced in the compost occupied by the recipient mycelium (Rm) cultures after their exposition to clouds of basidiospores

The occurrence of a contact between the recipient mycelia of the Rm cultures and the basidiospores produced by the sporocarps of the Db cultures was first checked by searching, in light microscopy, the basidiospores caught by the adhesive strips. In trays exposed to basidiospore clouds emitted by Db 243 cultures, basidiospores appeared equally distributed (about 50 basidiospores/microscopic field) along all the adhesive strips, i. e. along the entire length of all trays corresponding to the exposed Rm cultures (2 x 60 = 120 cm in length).

For the two studied combinations, first sporocarps appeared in the Rm cultures between 14 and 18 days after casing. To avoid spreading of the spores, fruiting bodies were harvested before they opened and exposed their gills. Selection of sporocarps for analysis was performed randomly, every day during one month and the sites of collection were distributed on the entire compost surfaces. 50 sporocarps (25 per tray) were collected for each combination.

Phenotypic variations in sporocarps of Rm cultures

Among the three strains used in this study, sporocarps differentiated by each strain were characterized by different cap colors: precisely Bs177 sporocarps had a dark brown color; those of strain Bs256 were medium brown while those of strain Bs243 showed a creamy color (Fig. 4). For combination Db Bs243/Rm Bs177, sporocarps differentiated on both trays of Rm culture possessed the same morphology and cap color (dark brown) as those observed in strain Bs177. However, in both trays corresponding to the combination Db Bs243/Rm Bs256, two different cap colors were equally present. About half of the sporocarps showed the medium brown cap color previously found in sporocarps of the Rm strain Bs256 while about half of the sporocarps (collected on both trays) possessed a creamy color close to that of the Db strain Bs243 (Fig. 5). This suggested that those sporocarps did not derive from a simple event of fructification of the Rm Bs256 cultures and could represent hybrid strains. Accordingly, 18 sporocarps with this creamy color and 14 with medium brown caps were selected for further analyses.

Molecular characterization of sporocarps collected in Rm cultures by mitochondrial and nuclear CAPS markers

Two nuclear CAPS markers (based on the ITS region of the ribosomal unit and also on the 5' region of the *frk* gene) were used to look for hybrid genotypes. Genotypic analyses were carried out on total DNA independently extracted from 58 sporocarps (32 sporocarps from the Db243/Rm256 and 26 from Db243/Rm177).

For each DNA, the ITS and *frk* CAPS markers were digested by the restriction endonuclease *Hae*III (Fig. 6 and 7). For each experimental combination, the digesting profiles were compared with the profiles of the strains constituting the Rm and Db cultures (Fig. 3) and

those predicted in different reproduction processes leading to the various rearrangements of allelic forms of each marker (Table 2)

Moreover, to establish the mitochondrial haplotype of the heterokaryotic mycelium from which each collected sporocarp was issued, a primer pair i11U/i11R targeting the polymorphic intron *iAbi11* of the mitochondrial *cox1* gene was used in PCR reaction. Indeed, The generated PCR products of the three wild-type strains were previously demonstrated (Jalalzadeh et al. 2014) to be as followed: No amplification (intron is lacking) in Bs243 (profile “0”), a fragment of size 987 nt, corresponding to the *iAbi11* intron carrying a potentially functional *heg* (profile “S”) in Bs177, a fragment of size 2230 nt corresponding to the invasion of the *heg* of the *iAbi11* intron by a mobile ORF (profile “L”) in Bs256. As above, amplification was achieved which the total DNA of the 58 selected sporocarps and the resulting PCR products separated by agarose gel electrophoresis. The resulting profiles are compiled in table 3. All the 58 sporocarps, (issued from both combinations of Db and Rm cultures) possessed the mitochondrial haplotype of the strain of the Rm culture involved in the combination. This allows us to eliminate the hypothesis of sporocarps produced by heterokaryotic mycelia with the Db culture as single parental origin (such as the germination of a heterokaryotic spore of the Db culture or the mating between two compatible homokaryotic spores from this Db culture). Finally, the obtained mitochondrial haplotypes suggest the involvement of the Rm strain in all the differentiated sporocarps.

In Db 243/Rm 177 combination, Db strain had the genotype ITS (1/2) *frk* (1/2) *iAbi11* (0) and Rm strain had the genotype ITS (2/2) *frk* (1/1) *iAbi11* (S). All the 26 analyzed sporocarps had the same genotype as the recipient strain Bs177 established with these two CAPS loci as well as the same mitochondrial haplotype: ITS (1/2) and *frk* (1/2) *iAbi11*(0).

In Db243/Rm256 combination, Db strain had a genotype ITS (1/2) *frk* (1/2) *iAbi11* (0) and Rm strain had a genotype ITS (1/1) *frk* (1/2) *iAbi11* (L). Among the 32 selected sporocarps that were analyzed for this combination, two groups were distinguishable. The first group included 14

sporocarps which shared the same genotype as the Rm strain Bs256, i. e. ITS (1/1) *frk* (1/2) *iAbi11* (L). The remaining 18 sporocarps showed a hybrid genotype for both nuclear loci ITS (1/2) and *frk* (2/2) while carrying the mitochondrial haplotype of the recipient strain (Bs256). This suggested that these 18 sporocarps could be differentiated by hybrid heterokaryons resulting from outcrossing events between the heterokaryotic Rm of Bs256 and basidiospores from Db strain Bs243.

However, it is to be noted that, as shown in table 2, for both studied combinations, the sporocarps possessing CAPS markers profiles identical to those of the corresponding Rm strain, could correspond to fruiting of the Rm mycelia but also could be differentiated by a hybrid mycelia resulting from an outcrossing event via a Buller phenomenon. Accordingly, CAPS markers were further analysed by sequencing.

Genotype of selected sporocarps deduced from the sequences of the nuclear CAPS markers

As indicated above, nuclear CAPS markers ITS and *frk* and mitochondrial RFLP marker have allowed to characterize three different profiles in the 58 studied sporocarps collected in Rm trays corresponding to the Db 243/Rm 177 and Db 243/Rm 256 combinations (Table 3): the 26 sporocarps analyzed from the first combination possessed all the same profile: A(2/2), D(1/1), mt haplotype S, on the contrary, two different profiles were found in sporocarps from the other combination, one found in 18 sporocarps with creamy cap color: C(1/2), E (2/2), mt haplotype L and one found in 14 sporocarps with medium brown cap color: B(1/1), F(1/2), mt haplotype L.

In order to precise the events involved in the generation of these three profiles, six sporocarps of each type were randomly selected and sequenced.

Examples of the different sequences obtained with both nuclear markers and carried by sporocarps harvested in the Db243/Rm256 combination are presented in Fig. S1 for ITS and Fig. S2 for *frk* and compared with the allelic forms found in the six nuclei of the three wild strains used in this study.

Sequence analyses of the ITS and *frk* markers confirmed that the six selected sporocarps harvested in the Rm culture trays of the Db 243/Rm 177 possessed a strictly identical sequences, and especially all the heteromorphisms of the Rm Bs177 strain ITS (*its1/its2*), *frk* (*frk1/frk1*), thus confirming that these six randomly selected sporocarps were all issued from the fruiting of the heterokaryotic mycelium inoculated in the compost.

In sporocarps selected in the Rm culture trays from the Db 243/Rm 256, the sequences of the ITS and *frk* markers have shown that:

- (1) among the six sporocarps with a medium brown cap color, i. e. the phenotype of the recipient wild strain Bs256, and also the same CAPS profiles B (1/1), F(1/2), mt haplotype L of this strain, only two possessed the same ITS and *frk* sequences as Bs256 (with all the heteromorphisms): ITS (*its5/its5*), *frk* (*frk4/frk5*); and thus resulted from fruiting of the Rm 256.

- (2) on the contrary, for the four others sporocarps, despite they also share the same phenotype (medium brown cap color) and same CAPS profiles for both nuclear markers than Rm 256 wild strain, sequences have shown that they possess a different allelic form ITS (*its4/its5*), *frk* (*frk2/frk4*). The comparison of this allelic combination with those of the Db 243: ITS (*its3/its4*), *frk* (*frk2/frk3*) and of the Rm256 ITS (*its5/its5*), *frk* (*frk4/frk5*) suggests that these four sporocarps have been produced by heterokaryotic mycelia containing a nucleus from Bs243 ITS (*its4*) *frk* (*frk2*) and one nucleus from Bs256 ITS (*its5*) *frk* (*frk4*). As the combination involved a contact between a heterokaryotic mycelium and a cloud of basidiospores (mostly heterokaryotic and also

containing a little number (around) 10 % of homokaryotic spores), the observed hybrids were assumed to result from a Buller phenomenon.

- (3) in the same way, sequences of the six sporocarps with both a putatively hybrid profil C(1/2), E(2/2), mt haplotype L and a creamy cap color have revealed a rearranged allelic form ITS (*its3/its5*) *frk* (*frk3/frk4*) which can be explained by a combination of one nucleus from the Db 243 ITS (*its3*), *frk* (*frk3*) and one nucleus from the heterokaryotic Rm 256 ITS (*its5*) *frk* (*frk4*).

Finally, the sequences of the differentiated sporocarps of the Db 243/Rm 177 combination failed to reveal any hybrid mycelia. On the contrary, the sequences of the differentiated sporocarps from a combination involving the same recipient donor of basidiospores Db 243 but a different recipient heterokaryotic mycelium (Rm 256 instead of Rm 177), appears to lead to a majority (10/12 analyzed sporocarps, more than 80 %) of hybrids, assumed to result from a Buller phenomenon. Interestingly, both nuclei of the Db strain appears equally distributed in the hybrids (six sporocarps with the nucleus carrying the *its3*, *frk3* alleles and four with the nucleus characterized by the *its4*, *frk2* alleles). On the contrary, all the analyzed hybrids appeared to contain the same nucleus from the heterokaryotic Rm (*its5*, *frk4*), suggesting that the other nucleus of the heterokaryon Rm 256 cannot be involved in the Buller phenomenon with Db 243. This has to be brought near the fact that, no Buller phenomenon was found in combination involving another Rm (Bs177) with the same Db.

Discussion

Four processes can potentially generate fertile heterokaryons in Rm trays: (1) fructification of the heterokaryotic recipient mycelia Rm, (2) fructification of the heterokaryotic basidiospores from Db cultures via Pseudohomothallism, (3) selfing between two homokaryotic basidiospores from Db cultures via heterothallism and (4) outcrossing between a homokaryotic spore (or the

mycelium grown from it) from a Db sporocarpe and the heterokaryotic mycelium of the Rm culture, via the Buller phenomenon.

As the recipient mycelia were heterokaryotic, one would expect a large number of sporocarpes resulting from fructification of these mycelia. Additionally, as the Bs243 strain of the Db culture was also a heterokaryotic strain with mostly bisporic basidia and produced more than 90% of heterokaryotic basidiospores, one would also expect that some of the sporocarpes differentiated in recipient trays could result from germination of these self-fertile basidiospores.

Among the 58 analyzed sporocaps from both combinations Db 243/Rm 177 and Db 243/Rm 256, none revealed the genotype of the Db strain Bs243 for the nuclear loci ITS and *frk* nor for the mitochondrial haplotype (profile 0). From this, it can be concluded that, in this case, fructification of heterokaryotic basidiospores as well as selfing between two homokaryotic basidiospores were not involved in the production of the collected sporocarpes. This result is consistent with the result of Callac et al. (2006) in which no sporocarpe was issued from germinating heterokaryotic basidiospores.

In combination Db 243/Rm 177, all the 26 analysed sporocarpes possessed the same genotype and haplotype as the Rm strain Bs177 showing that these sporocarpes resulted from a simple event of fructification of the heterokaryotic Rm.

In combination Db 243/Rm 256, the 18 analyzed sporocarps showing a creamy cap color phenotype, were shown to result from a heterocaryotic mycelium possessing one nucleus from the Db strain Bs243 (*its4*, *frk3*) and one nucleus from the Rm strain Bs256 (*its5*, *frk4*).

The sporocarpes of this later combination which possessed a medium brown cap color phenotype and a CAPS profile identical to the Rm culture of strain Bs256 were shown to possess heterogenous genotypes. Indeed, sequence analyses of ITS and *frk* regions confirmed, for two sporocarpes, their identity with strain Bs256. On the contrary, four other sporocarpes were shown

to result from a Buller phenomenon leading to a heterokaryotic mycelium composed of one nucleus from Db strain Bs243 (*its3*, *frk2*) and one nucleus from Rm strain Bs256 (*its5*, *frk4*).

While under random conditions one would expect the equal contribution of both nuclei of each parental strain in the hybrids, sequences obtained in this combination Db 243/Rm 256 have shown an equal contribution of both nuclei of the Db strain Bs243 but only one nucleus from Rm strain Bs256. Our results also showed that all the hybrids harbored the mitochondria of the heterokaryon Rm 256. In experiment of Callac et al. (2006) with a recipient homokaryotic mycelium, the mitochondria of hybrid isolates were also shown to be inherited from the recipient mycelia.

All these results suggest an important role of the Buller phenomenon, involving basidiospores and heterokaryotic mycelia, in the genetic diversity of populations of *A. bisporus* var. *bisporus*. However, they also suggest possibilities of still unknown mechanisms, which would control this phenomenon and may depend on the heterokaryotic mycelia involved in the crossing.

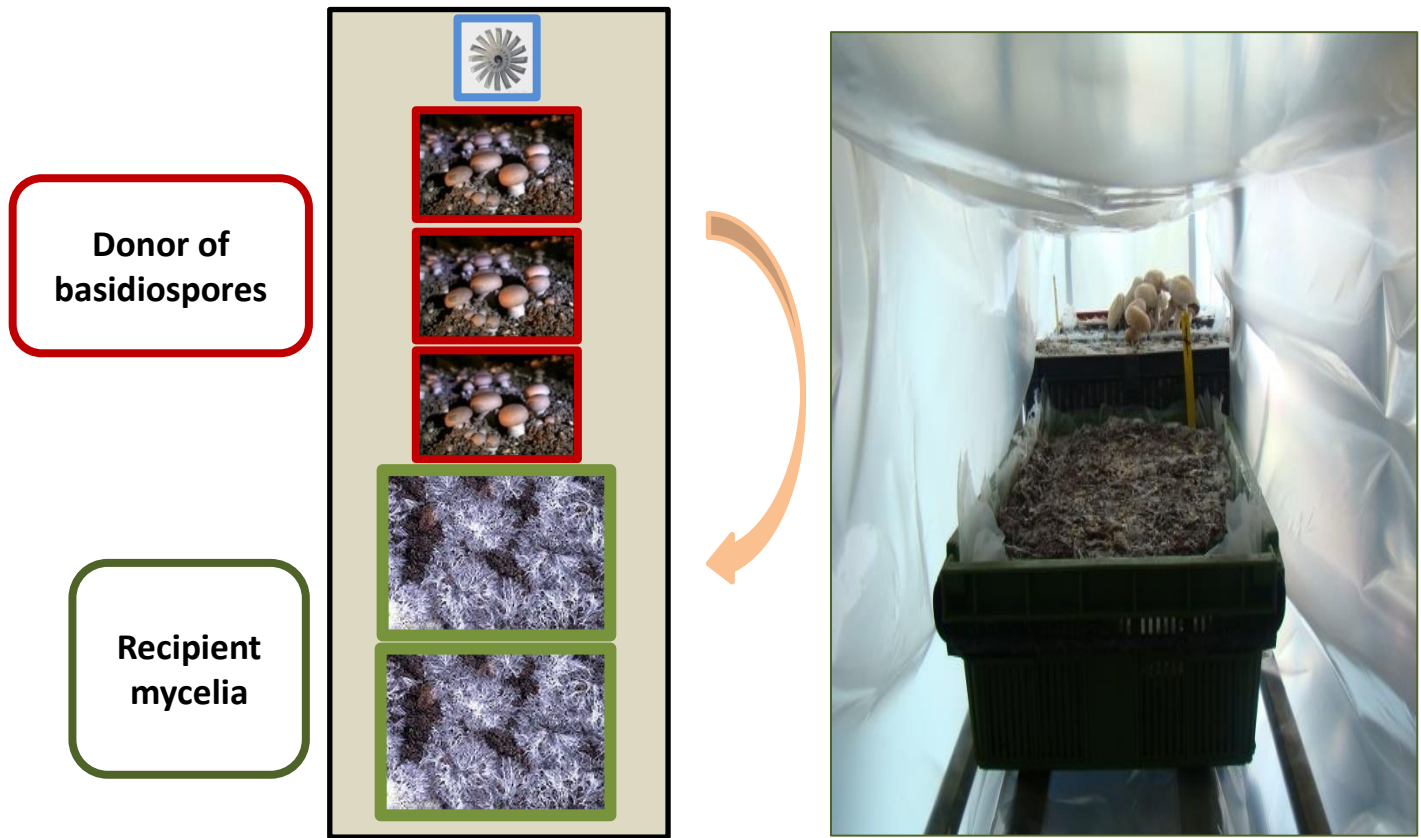


Figure 1- Schematic representation and photography of the experimental process of combinations used in this study. The donor of basidiospores and the recipient mycelia cultures are isolated in a plastic compartment

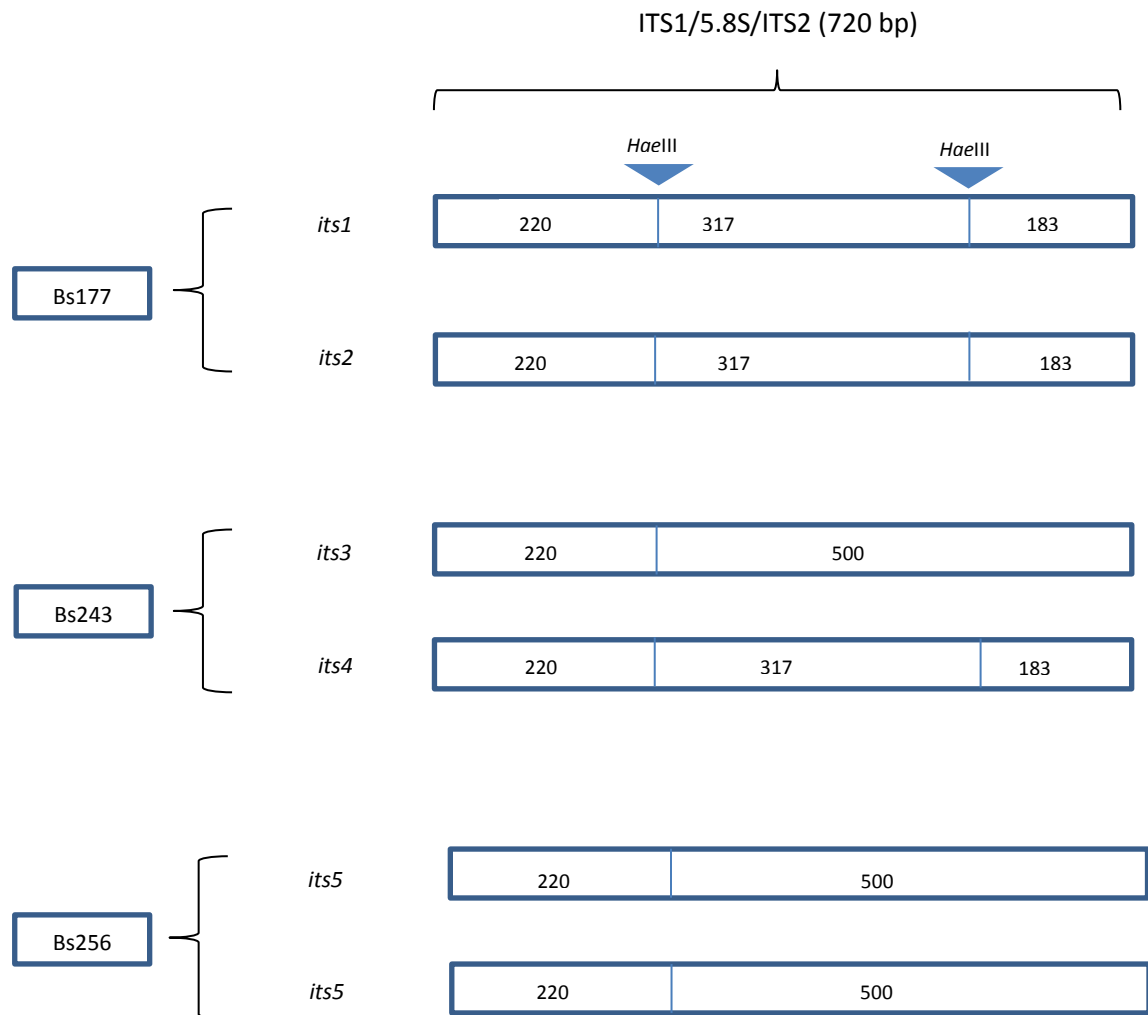


Figure 2a- *HaeIII* restriction maps of each allelic form of the molecular marker ITS region and carried by the six nuclei of the *A. bisporus* var. *bisporus* heterokaryotic strains Bs177, Bs243, Bs256. The sizes of the restriction fragments are indicated in bp

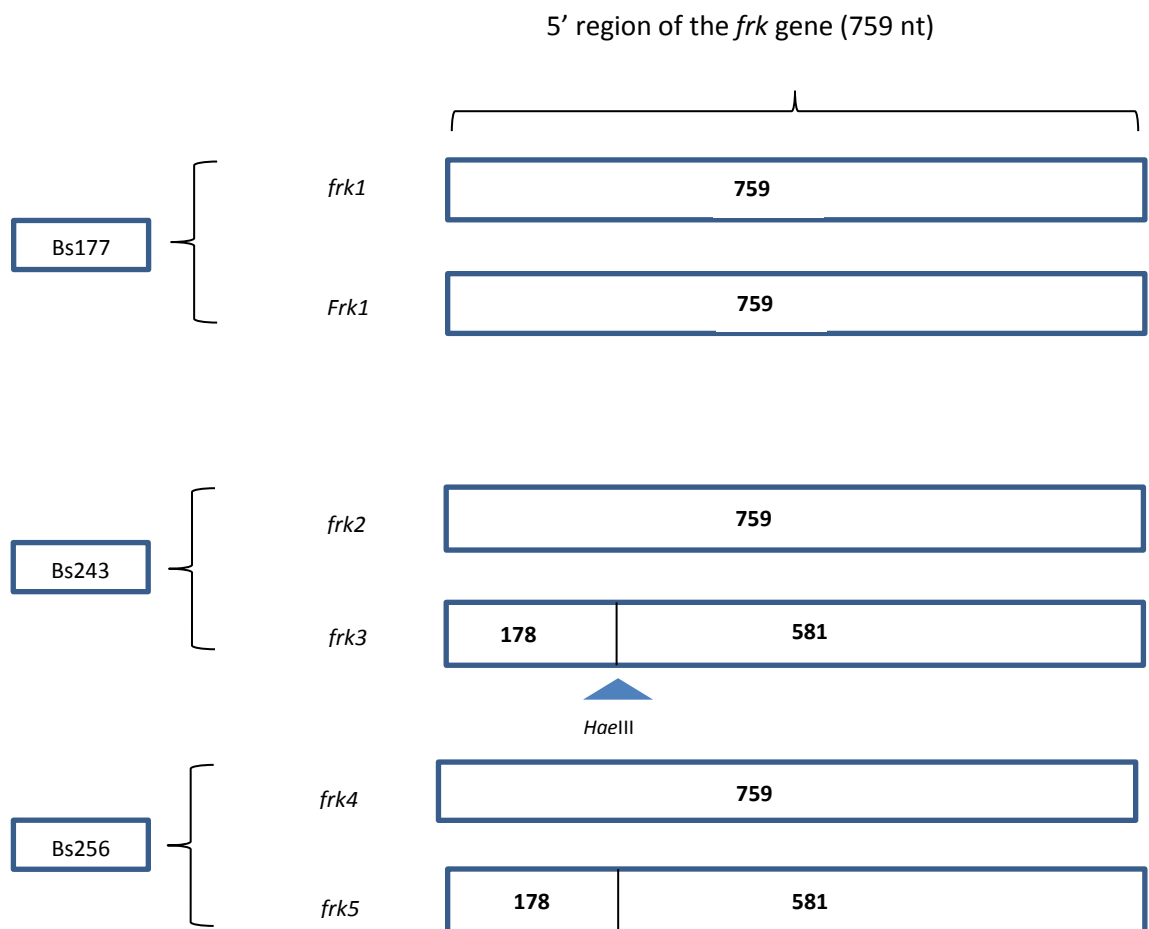


Figure 2b- *Hae*III restriction maps of each allelic form of the molecular marker defined in the 5' region of the *frk* gene and carried by the six nuclei of the *A. bisporus* var. *bisporus* heterokaryotic strains Bs177, Bs243, Bs256. The sizes of the restriction fragments are indicated in bp

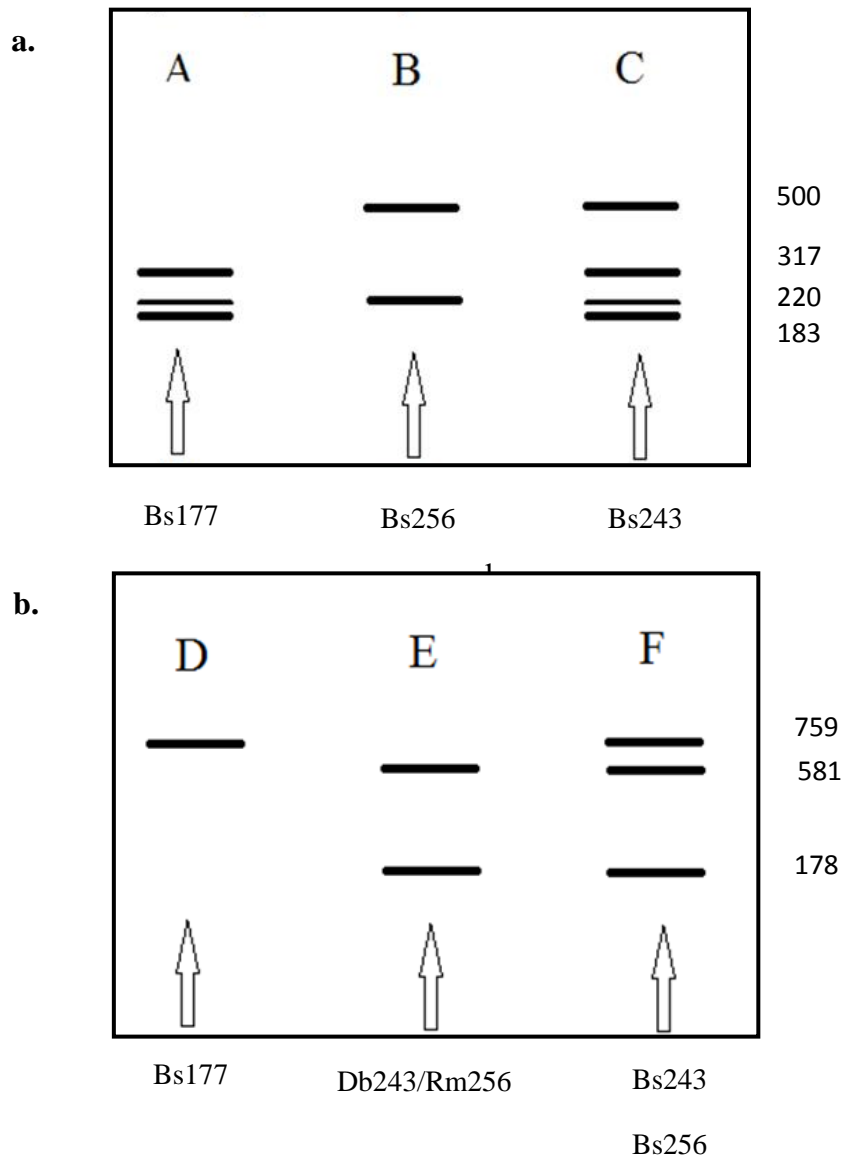


Figure 3- Schematic representation of the electrophoretic profiles of the ITS PCR product (a) and of the *frk* PCR product (b) for the three studied strains *A. bisporus* strains, after digestion by *Hae*III



Figure 4- Sporocarpe with dark brown color in strain Bs177; with medium brown color in strain Bs256 and creamy color in strain Bs243

a.



b.



Figure 5- Evidence of phenotypic variations among sporocarps resulting from the combination Db 243/Rm 256 (a); sporocarpe N°6 with creamy color and sporocarpe N°8 with medium brown cap color both from combination Db 243/Rm 256 (b)

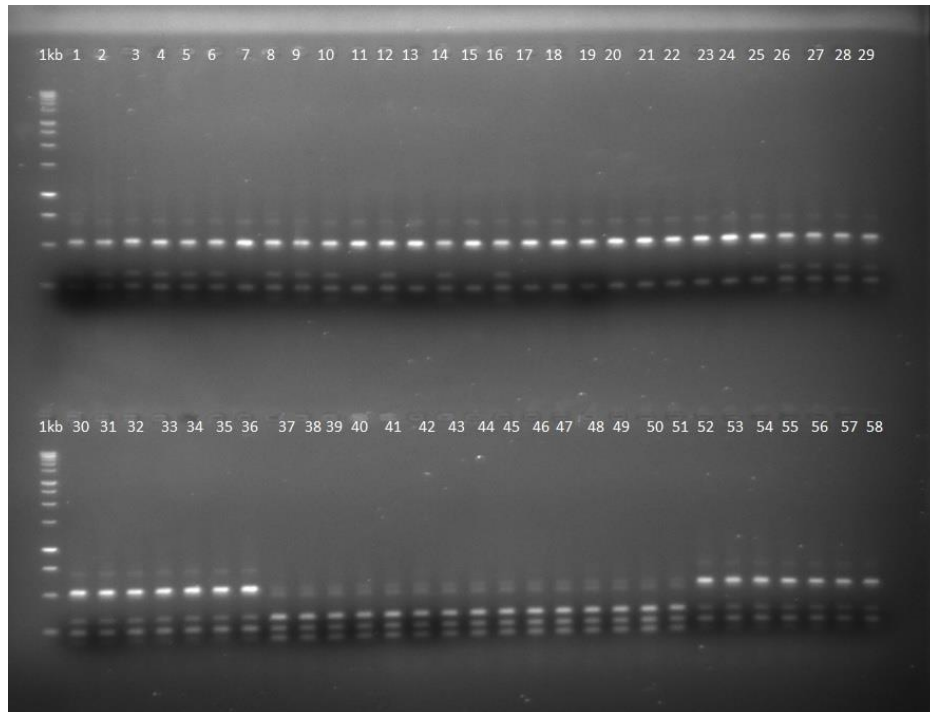


Figure 6- Electrophoretic patter of ITS PCR products from 58 sporocarpes resulting from the two analyzed combinations, after digestion by the restriction endonuclease *HaeIII*. 1kb represents the 1Kb DNA ladder from Promega corp. The number above each lane corresponds to the name of each selected and analyzed sporocarpe

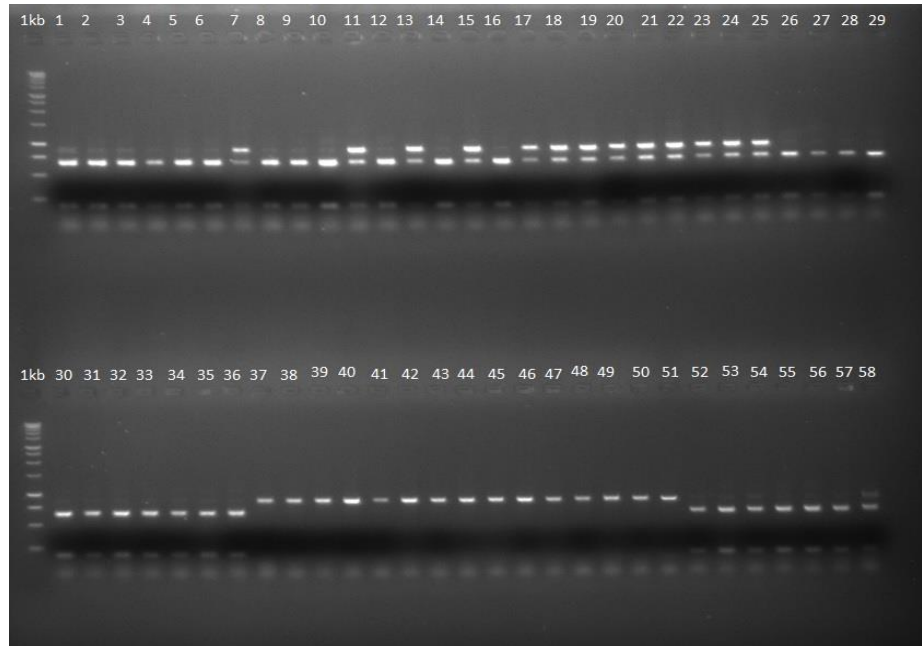


Figure 7- Electrophoretic pattern of *frk* PCR products from 58 sporocarps resulting from both analyzed combinations, after digestion by the restriction endonuclease *HaeIII*. 1kb represents the 1Kb DNA ladder from Promega corp. The number above each lane corresponds to the name of each selected and analyzed sporocarpe

Table 1- Primer sequences, Sequence allelic forms and CAPS allelic forms for three studied strains Bs177, Bs243 and Bs256

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Sequence allelic forms			Restriction enzyme	CAPS allelic forms (DNA fragments in bp)	CAPS profile		
		Bs177	Bs243	Bs256			Bs177	Bs243	Bs256
ITS-5	5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3'	<i>its1/its2</i>	<i>its3/its4</i>	<i>its5/its5</i>	<i>HaeIII</i>	1 (500, 220)	2/2 (A)	1/2 (C)	1/1 (B)
ITS-4	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'					2 (317, 220, 183)			
PR6U	5'CAATCTCAAGCTTGCCTGG3'	<i>frk1/frk1</i>	<i>frk2/frk3</i>	<i>frk4/frk5</i>	<i>HaeIII</i>	1 (759)	1/1(D)	1/2 (F)	1/2 (F)
PR6R	5'AGGTGACATGTCAGAAGCGC3'					2 (581, 178)			

Table 2- Expected genotype and mitochondrial haplotype resulting from different events of fruiting and/or crossing occurring in both different studied combinations: Db 243/ Rm 177 and Db 243/ Rm 256

	Experimental Combinations					
	Db 243/ Rm 177			Db 243/ Rm 256		
	Molecular marker profile (genotype of the sporocarpe)			Molecular marker profile (genotype of the sporocarpe)		
	ITS	<i>frk</i>	<i>iAbi11</i>	ITS	<i>frk</i>	<i>iAbi11</i>
Fruiting of Rm	A (2/2)	D (1/1)	S	B (1/1)	F (1/2)	L
Fruiting of heterokaryotic spores (from Db sporocarpes)	C (1/2)	F (1/2)	0	C (1/2)	F (1/2)	0
Selfing (crossing between two homocaryotic spores from Db sporocarpes)	C (1/2)	F (1/2)	0	C (1/2)	F (1/2)	0
Outcrossing (via Buller) between Rm (one nucleus) + Db spores (one nucleus)	A (2/2) or C (1/2)	D (1/1) or F (1/2)	S	B (1/1) or C (1/2)	D (1/1) or F (1/2) or E (2/2)	L

Table 3- Phenotype, nuclear genotypes and mitochondrial haplotypes of the 58 sporocarps, analyzed in the studied combinations Db 243/Rm 177 and Db 243/Rm 256

Combination	N° of analyzed sporocarpes	Cap color	Molecular marker			N° of sporocarpes analyzed by sequencing	Event		
			ITS CAPS	<i>frk</i> CAPS	<i>iAbi11</i>		ITS	<i>frk</i>	
Db 243/Rm 177	26	Dark brown	A (2/2)	D (1/1)	S	6	<i>its1/its2</i>	<i>frk1/frk1</i>	Fruiting of Rm 177
Db 243/Rm 256	18	Creamy	C (1/2)	E (2/2)	L	6	<i>its4/its5</i>	<i>frk3/frk4</i>	Buller between Db 243/Rm 256
	14	Medium brown	B (1/1)	F (1/2)	L	4	<i>its3/its5</i>	<i>frk2/frk4</i>	Buller between Db 243/Rm 256
						2	<i>its5/its5</i>	<i>frk4/frk5</i>	Fruiting of Rm 256

References

- Buller, AHR (1931) Researches on fungi, vol. IV. Longmans, Green and Co., London, United Kingdom
- Callac P, Imbernon M, Kerrigan RW, Olivier JM (1996) The two life cycles of *Agaricus bisporus*. Mushroom biology and mushroom product. Proceedings of the Second International Conference. Royse (ed) Penn State Univ. 57-66
- Callac P, Spataro C, Caille A, Imbernon M (2006) Evidence for Outcrossing via the Buller Phenomenon in a Substrate Simultaneously Inoculated with Spores and Mycelium of *Agaricus bisporus*. Appl Environ Microbiol 72 (4): 2366–2372
- Imbernon M, Callac P, Gasqui P, Kerrigan RW, Velcko Jr AJ (1996) BSN, the primary determinant of basidial spore number and reproductive mode in *Agaricus bisporus*, maps to chromosome 1 Mycologia 88: 749–761.
- Jalalzadeh B, Sare Carras I, Ferandon C, Callac P, Farsi M, Savoie JM, Barroso G (2014) The intraspecific variability of mitochondrial genes of *Agaricus bisporus* reveals an extensive group I intron mobility combined with low nucleotide substitution rates. Curr. Genet
- Hanahan D (1983) Studies on the transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol 166 (4): 557–580
- Kerrigan RW (1990) Evidence of genetic divergence in two populations of *Agaricus bisporus*. Mycol. Res 94:721–733
- Kerrigan RW, Horgen PA, Anderson JB (1993a) the California Population of *Agaricus bisporus* Comprises at Least Two Ancestral Elements. Systematic Botany 18(1): 123-136
- Noël T, Labarère J (1987) Isolation of DNA from *Agrocybe aegerita* for the construction of a genomic library in *Escherichia coli*. Mushroom Sci. 12:187–201
- Raper CA, Raper JR, Miller RE (1972) Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. Mycologia 64:1088–1117.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acides Res 22:4673–4680
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic press, San Diego, p 315–322
- Xu J, Kerrigan RW, Callac P, Horgen PA, Anderson JB (1997) Genetic structure of natural populations of *Agaricus bisporus*, the commercial button mushroom. J. Hered 88: 482-488
- Xu J, Kerrigan RW, Sonnenberg, AS, Callac P, Horgen PA, Anderson JB (1998) Mitochondrial DNA variation in natural populations of the mushroom *Agaricus bisporus*. Mol. Ecol 7: 19–33

Xu J, Desmerger C, Callac P (2002) Fine-scale genetic analyses reveal unexpected spatial-temporal heterogeneity in two natural populations of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. Microbiology 148:1253–1262

a.

>its1

TGTTTTCTAGCTGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGTATGTGCACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTTTGTA
GTCTTTTTTCAGGTATTGGAGGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTTTTCTGCTGGATGTAAGGACTTGCAGTGTGAAAACAGTGTCTGTCCCTT
TACCTTGCCCATGGAATCTTTTTCTGTAGAGTCTATGTTATTCATTATACTCTTAGAATGTCATTGAATGTCTTTACATGGGCTA
TGCCTATGAAAATTATTATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTC
ATTATATTCTCAACTCTCCAATACTTTTGTGTAAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGTTTGTCTGGCCCTTATTGGGGTCAGCTCCT
CTGAAATGCATTAGCGGAAACGTCTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAACTTATCTACACTGGCGAGGGGATTGCTTTCTGATGTTCA
GCTTCTAATCGTCTAAGGACAATTTCTTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA

b.

>its2

TGTTTTCTAGCTGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGTATGTGCACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTTTGTA
GTCTTTTTTCAGGTATTGGAGGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTTTTCTGCTGGATGTAAGGACTTGCAGTGTGAAAACAGTGTCTGTCCCTT
TACCTTGCCCATGGAATCTTTTTCTGTAGAGTCTATGTTATTCATTATACTCTTAGAATGTCATTGAATGTCTTTACATGGGCTA
TGCCTATGAAAATTATTATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTC
ATTATATTCTCAACTCTCCAATACTTTTGTGTAAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGTTTGTCTGGCCCTTATTGGGGTCAGCTCCT
CTGAAATGCATTAGCGGAAACGTCTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAACTTATCTACACTGGCGAGGGGATTGCTTTCTGATGTTCA
GCTTCTAATCGTCTAAGGACAATTTCTTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA

c.

>its3

TGTTTTCTAGCTGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGTATGTGCACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTTTGTA
GTCTTTTTTCAGGTATTGGAGGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTTTTCTGCTGGATGTAAGGACTTGCAGTGTGAAAACAGTGTCTGTCCCTT
TACCTTGCCCATGGAATCTTTTTCTGTAGAGTCTATGTTATTCATTATACTCTTAGAATGTCATTGAATGTCTTTACATGGGCTA
TGCCTATGAAAATTATTATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTC
ATTATATTCTCAACTCTCCAATACTTTTGTGTAAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGTTTGTCTGGCCCTTATTGGGGTCAGCTCCT
CTGAAATGCATTAGCGGAAACGTCTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAACTTATCTACACTGGCGAGGGGATTGCTTTCTGATGTTCA
GCTTCTAATCGTCTAAGGACAATTTCTTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA

d.

>its4

TGTTTTCTAGCTGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGTATGTGCACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTTTGTA
GTCTTTTTTCAGGTATTGGAGGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTTTTCTGCTGGATGTAAGGACTTGCAGTGTGAAAACAGTGTCTGTCCCTT
TACCTTGCCCATGGAATCTTTTTCTGTAGAGTCTATGTTATTCATTATACTCTTAGAATGTCATTGAATGTCTTTACATGGGCTA
TGCCTATGAAAATTATTATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTC
ATTATATTCTCAACTCTCCAATACTTTTGTGTAAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGTTTGTCTGGCCCTTATTGGGGTCAGCTCCT
CTGAAATGCATTAGCGGAAACGTCTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAACTTATCTACACTGGCGAGGGGATTGCTTTCTGATGTTCA
GCTTCTAATCGTCTAAGGACAATTTCTTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA

e.

>its5

TGTTTTCTAGCTGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGTATGTGCACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTTTGTA
GTCTTTTTTCAGGTATTGGAGGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTTTTCTGCTGGATGTAAGGACTTGCAGTGTGAAAACAGTGTCTGTCCCTT
TACCTTGCCCATGGAATCTTTTTCTGTAGAGTCTATGTTATTCATTATACTCTTAGAATGTCATTGAATGTCTTTACATGGGCTA
TGCCTATGAAAATTATTATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTC
ATTATATTCTCAACTCTCCAATACTTTTGTGTAAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGTTTGTCTGGCCCTTATTGGGGTCAGCTCCT
CTGAAATGCATTAGCGGAAACGTCTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAACTTATCTACACTGGCGAGGGGATTGCTTTCTGATGTTCA
GCTTCTAATCGTCTAAGGACAATTTCTTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA

f.

```
S10 (its4/its5)
TGTTTTCTAGATGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGTATGTGCACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTTTGTA
GTCTTTTTCAGGTATTGGAGGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTTTTCTGCTGGATGTAAGGACTTGCAGTGTGAAAACAGTGCTGTCCTT
TACCTTGGCCATGGAATCTTTTCTGTTAGAGTCTATGTTATTCATTATACTCTTAGAATGTCATTGAATGCTTTACATGGGCTA
TGCCTATGAAAATTATTATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTC
ATTATATTCTCAACTCTCCAATACTTTGTTGTAAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGTTTGCTGGCTTCTTACCTTCTGGGGTCAGCTCCT
CTGAAATGCATTAGCGGAACTCGTCTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAACTTATCTACACTGGCGAGGGGATTGCTTTCTGATGTTCA
GCTTCTAATCGTCTAAGGACAATTTCTTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA
```

g.

```
>S11 (its5/its5)
TGTTTTCTAGATGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGTATGTGCACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTTTGTA
GTCTTTTTCAGGTATTGGAGGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTTTTCTGCTGGATGTAAGGACTTGCAGTGTGAAAACAGTGCTGTCCTT
TACCTTGGCCATGGAATCTTTTCTGTTAGAGTCTATGTTATTCATTATACTCTTAGAATGTCATTGAATGCTTTACATGGGCTA
TGCCTATGAAAATTATTATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTC
ATTATATTCTCAACTCTCCAATACTTTGTTGTAAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGTTTGCTGGCTTCTTACCTTCTGGGGTCAGCTCCT
CTGAAATGCATTAGCGGAACTCGTCTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAACTTATCTACACTGGCGAGGGGATTGCTTTCTGATGTTCA
GCTTCTAATCGTCTAAGGACAATTTCTTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA
```

h.

```
>S17 (its3/its5)
TGTTTTCTAGTTGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGTATGTGCACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTTTGTA
GTCTTTTTCAGGTATTGGAGGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTTTTCTGCTGGATGTAAGGACTTGCAGTGTGAAAACAGTGCTGTCCTT
TACCTTGGCCATGGAATCTTTTCTGTTAGAGTCTATGTTATTCATTATACTCTTAGAATGTCATTGAATGCTTTACATGGGCTA
TGCCTATGAAAATTATTATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTC
ATTATATTCTCAACTCTCCAATACTTTTGTGTAAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGTTTGCTGGCTTCTTACCTTCTGGGGTCAGCTCCT
CTGAAATGCATTAGCGGAACTCGTCTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAACTTATCTACACTGGCGAGGGGATTGCTTTCTGATGTTCA
GCTTCTAATCGTCTAAGGACAATTTCTTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA
```

Figure S1– Sequences of the five ITS allelic forms carried by the six nuclei of the three *A. bisporus* var. *bisporus* wild strains Bs177 (*its1/its2*), Bs243 (*its3/its4*) and Bs256 (*its5/its5*) (a-e); sequence of the ITS region in sporocarps S10, S11 and S17 from combination Db 243/Rm 256. (f-h). The polymorphic SNP allowing discrimination between the allelic forms are framed in colors. Sequence of the ITS marker from the sporocarp S10 reveals four heteromorphic nucleotides that can be explained by pairing allele *its4* from strains Bs243 and allele *its5* from strain Bs256. ITS sequence of sporocarp S11 represents 100% nt identity with the orthologous sequence in strain Bs256. In contrast, sequence of sporocarp S17 grouped the allele *its3* from strain Bs243 and allele *its5* from strain Bs256.

a.

>frk1

ATGGGAAACGTGGAATGTCGGTTCGACCAAAGTTCGACGACGGACTGCCGTGATAGGTTCACTGACGTCACTATTATTAGCACGATC
CGGAGCTCCGCGGTGAGAAATTCCAAACCTTTCCCAATTCCAATGCTACCTCGTATCATACTCGAAAATCTGCAAAGGATCGATCCG
GATGCTCAGTTCACCGGACATCTTCCCAAGGCTCAGTCATCACTGGTCAAACGTATTTTCGTGAAATCAGGATCGCCGTCGGAGTCT
GAGCAGTATCTTGGCGAAGCGCGATCACTCGAAGCCATAGGTACCGCAGCTCCTGGGCTTGCGCCAGCGATGATTGCCTACGGTAAC
GGTGAAGATGGGAGCCTTTCTTTGTTTCGGAATACAAGGACATGGCGCCTCTGTCTTCGGGTGCCTCCGATCTTCTAGCGAAGAGG
CTGGCAACTGAGTTACATCAGTACAAGAGCCACGAGGGCTTTGGGTTTGGGTTCCGACTTTTGTGGAGCAACGCGTCAGAGGAAT
GGCTGGTATACAACCTTGGGAGCAATGCTACAGTAATTTGATAGGAATCTGCTAGATGGTCTGTCTCGACGAGAGCATGCGCTCTC
GTGACGAAGGGAGAAAAGATACGAGAAAGTACGTGCCTTTGACCGAGCGAATTGAGATGGCAGCTAATTAGTTAAAATGAACGCA
AATCAGGGTGATTCCCAGTTTGCTTGGTACGAGAGTACAATCTCGGTTATGTCTTTCTTGA

b.

>frk2

ATGGGAAACGTGGAATGTCGGTTCGACCAAAGTTCGACGACGGACTGCCGTGATAGGTTCACTGACGTCACTATTATTAGCACGATC
CGGAGCTCCGCGGTGAGAAATTCCAAACCTTTCCCAATTCCAATGCTACCTCGTATCATACTCGAAAATCTGCAAAGGATCGATCCA
GATGCTCAGTTCACCGGAAATCTTCCCAAGGTTCACTCATCACTGGTCAAACGTATTTTCGTGAAATCAGGATCGCCGTCGGAGTCT
GAGCAGTATCTTGGCGAAGCGCGATCACTCGAAGCCATAGGTACCGCAGCTCCTGGGCTTGCGCCAGCGATGATTGCCTACGGTAAC
GGTGAAGATGGGAGCCTTTCTTTGTTTCGGAATACAAGGATATGGCGCCTCTGTCTTCGGGTGCCTCTGATCTTCTAGCGAAGAGG
CTGGCAACTGAGTTACATCAGTACAAGAGCCACGAGGGCTTTGGGTTTGGGTTCCGACTTTTGTGGAGCAACGCGTCAGAGGAAT
GGCTGGTATACAACCTTGGGAGCAATGCTACAGTAATTTGATAGGGAATCTGCTAGATGGTCTGTCTCGACGAGAGTATGCGCTCTC
ATGACGAAGGGAGAAAAGATACGAGAAAGTACGTGCCTTTGACCGAGCGAATTGAGATGGCAGCTAATTAGTTAAAATGAACGCA
AATCAGGGTGATTCCCAGTTTGCTTGGTACGAGAGTACAATCTCGGTTATGTCTTTCTTGA

c.

>frk3

ATGGGAAACGTGGAATGTCGGTTCGACCAAAGTTCGACGACGGACTGCCGTGATAGGTTCACTGACGTCACTATTATTAGCACGATC
CGGAGCTCCGCGGTGAGAAATTCCAAACCTTTCCCAATTCCAATGCTACCTCGTATCATACTCGAAAATCTGCAAAGGATCGATCCA
GATGCTCAGTTCACCGGAAATCTTCCCAAGGTTCACTCATCACTGGTCAAACGTATTTTCGTGAAATCAGGATCGCCGTCGGAGTCT
GAGCAGTATCTTGGCGAAGCGCGATCACTCGAAGCCATAGGTACCGCAGCTCCTGGGCTTGCGCCAGCGATGATTGCCTACGGTAAC
GGTGAAGATGGGAGCCTTTCTTTGTTTCGGAATACAAGGATATGGCGCCTCTGTCTTCGGGTGCCTCTGATCTTCTAGCGAAGAGG
CTGGCAACTGAGTTACATCAGTACAAGAGCCACGAGGGCTTTGGGTTTGGGTTCCGACTTTTGTGGAGCAACGCGTCAGAGGAAT
GGCTGGTATACAACCTTGGGAGCAATGCTACAGTAATTTGATAGGGAATCTGCTAGATGGCTGTCTCGACGAGAGTATGAACTCTC
GTGACGAAGGGAGAAAAGATACGAGAAAGTACGTGCCTTTGACCGAGCGAATTGAGATGGCAGCTAATTAGTTAAAATGAACGCA
AATCAGGGTGATTCCCAGTTTGCTTGGTACGAGAGTACAATCTCGGTTATGTCTTTCTTGA

d.

>frk4

ATGGGAAACGTGGAATGTCGGTTCGACCAAAGTTCGACGACGGACTGCCGTGATAGGTTCACTGACGTCACTATTATTAGCACGATC
CGGAGCTCCGCGGTGAGAAATTCCAAACCTTTCCCAATTCCAATGCTACCTCGTATCATACTCGAAAATCTGCAAAGGATCGATCCA
GATGCTCAGTTCACCGGAAATCTTCCCAAGGTTCACTCATCACTGGTCAAACGTATTTTCGTGAAATCAGGATCGCCGTCGGAGTCT
GAGCAGTATCTTGGCGAAGCGCGATCACTCGAAGCCATAGGTACCGCAGCTCCTGGGCTTGCGCCAGCGATGATTGCCTACGGTAAC
GGTGAAGATGGGAGCCTTTCTTTGTTTCGGAATACAAGGATATGGCGCCTCTGTCTTCGGGTGCCTCTGATCTTCTAGCGAAGAGG
CTGGCAACTGAGTTACATCAGTACAAGAGCCACGAGGGCTTTGGGTTTGGGTTCCGACTTTTGTGGAGCAACGCGTCAGAGGAAT
GGCTGGTATACAACCTTGGGAGCAATGCTACAGTAATTTGATAGGGAATCTGCTAGATGGCTGTCTCGACGAGAGTATGCGCTCTC
GTGACGAAGGGAGAAAAGATACGAGAAAGTACGTGCCTTTGACCGAGCGAATTGAGATGGCAGCTAATTAGTTAAAATGAACGCA
AATCAGGGTGATTCCCAGTTTGCTTGGTACGAGAGTACAATCTCGATTATGTCTTTCTTGA

e.

>frk5

```
ATGGGAAACGTGGAATGTCGGTTCGACCAAAGTTCGACGACGGACTGCCGTGATAGGTTCACTGACGTCACTATTATTAGCACGATC
CGGAGCTCCGCGGTGAGAAATTCCAAACCTTTCCCAATTCCAATGCTACCTCGTATCATACTCGAAAATCTGCAAAGGATCGATCCA
GATGCTCAGTTACCCGAAATCTTCCCAAGGTTCACTGATCCTACTGGTCAAACGTATTTCTGTGAAATCAGGATCGCCGTCGGAGTCT
GAGCAGTATCTTGGCGAAGCGCGATCACTCGAAGCCATAGGTACCGCAGCTCCTGGGCTTGCGCCAGCGATGATTGCCTACGGTAAC
GGTGAAGATGGGAGCCTTTCTTTGTTTCGGAATACAAGGATATGGCGCCTCTGTCTTCGGGTGCCTCTGATCTTCTAGCGAAGAGG
CTGGCAACTGAGTTACATCAGTACAAGAGCCACGAGGGCTTTGGGTTTGAGGTTCCGACTTTTGTGGAGCAACGCGTCAGAGGAAT
GGCTGGTATACAACCTTGGGAGCAATGCTACAGTAATTTGATAGGGAATCTGCTAGATGGTCTGTCTCGACGAGAGTATGGCTCTC
ATGACGAAGGGAGAAAAGATACGAGAAAGTACGTGCCTTTGACCGAGCAATTGAGATGGCAGCTAATAGTTAAAATGAACGCA
AATCAGGGTGATTCCCAGTTGCTTGGTACGAGAGTACAGTCTCGTTATGTCTTTCTTGA
```

f.

>S10 (frk3/frk4)

```
ATGGGAAACGTGGAATGTCGGTTCGACCAAAGTTCGACGACGGACTGCCGTGATAGGTTCACTGACGTCACTATTATTAGCACGATC
CGGAGCTCCGCGGTGAGAAATTCCAAACCTTTCCCAATTCCAATGCTACCTCGTATCATACTCGAAAATCTGCAAAGGATCGATCCA
GATGCTCAGTTACCCGAAATCTTCCCAAGGTTCACTGATCCTACTGGTCAAACGTATTTCTGTGAAATCAGGATCGCCGTCGGAGTCT
GAGCAGTATCTTGGCGAAGCGCGATCACTCGAAGCCATAGGTACCGCAGCTCCTGGGCTTGCGCCAGCGATGATTGCCTACGGTAAC
GGTGAAGATGGGATGCCTTTCTTTGTTTCGGAATACAAGGATATGGCGCCTCTGTCTTCGGGTGCCTCTGATCTTCTAGCGAAGAGG
CTGGCAACTGAGTTACATCAGTACAAGAGCCACGAGGGCTTTGGGTTTGAGGTTCCGACTTTTGTGGAGCAACGCGTCAGAGGAAT
GGCTGGTATACAACCTTGGGAGCAATGCTACAGTAATTTGATAGGGAATCTGCTAGATGGCCTGTCTCGACGAGAGTATGGCTCTC
GTGACGAAGGGAGAAAAGATACGAGAAAGTACGTGCCTTTGACCGAGCAATTGAGATGGCAGCTAATAGTTAAAATGAACGCA
AATCAGGGTGATTCCCAGTTGCTTGGTACGAGAGTACAGTCTCGTTATGTCTTTCTTGA
```

g.

>S17 (frk2/frk4)

```
ATGGGAAACGTGGAATGTCGGTTCGACCAAAGTTCGACGACGGACTGCCGTGATAGGTTCACTGACGTCACTATTATTAGCACGATC
CGGAGCTCCGCGGTGAGAAATTCCAAACCTTTCCCAATTCCAATGCTACCTCGTATCATACTCGAAAATCTGCAAAGGATCGATCCA
GATGCTCAGTTACCCGAAATCTTCCCAAGGTTCACTGATCCTACTGGTCAAACGTATTTCTGTGAAATCAGGATCGCCGTCGGAGTCTG
AGCAGTATCTTGGCGAAGCGCGATCACTCGAAGCCATAGGTACCGCAGCTCCTGGGCTTGCGCCAGCGATGATTGCCTACGGTAACG
GTGAAGATGGGAGCCTTTCTTTGTTTCGGAATACAAGGATATGGCGCCTCTGTCTTCGGGTGCCTCTGATCTTCTAGCGAAGAGGC
TGGCAACTGAGTTACATCAGTACAAGAGCCACGAGGGCTTTGGGTTTGAGGTTCCGACTTTTGTGGAGCAACGCGTCAGAGGAATG
GCTGGTATACAACCTTGGGAGCAATGCTACAGTAATTTGATAGGGAATCTGCTAGATGGTCTGTCTCGACGAGAGTATGGCGCTCTC
TGACGAAGGGAGAAAAGATACGAGAAAGTACGTGCCTTTGACCGACCGAATTGAGATGGCAGCTAATCTAGTTAAAATGAACGCA
ATCAGGGTGATTCCCAGTTGCTTGGTACGAGAGTACAGTCTCGTTATGTCTTTCTTGA
```

h.

>S11 (frk4/frk5)

```
ATGGGAAACGTGGAATGTCGGTTCGACCAAAGTTCGACGACGGACTGCCGTGATAGGTTCACTGACGTCACTATTATTAGCACGATC
CGGAGCTCCGCGGTGAGAAATTCCAAACCTTTCCCAATTCCAATGCTACCTCGTATCATACTCGAAAATCTGCAAAGGATCGATCCA
GATGCTCAGTTACCCGAAATCTTCCCAAGGTTCACTGATCCTACTGGTCAAACGTATTTCTGTGAAATCAGGATCGCCGTCGGAGTCT
GAGCAGTATCTTGGCGAAGCGCGATCACTCGAAGCCATAGGTACCGCAGCTCCTGGGCTTGCGCCAGCGATGATTGCCTACGGTAAC
GGTGAAGATGGGAGCCTTTCTTTGTTTCGGAATACAAGGATATGGCGCCTCTGTCTTCGGGTGCCTCTGATCTTCTAGCGAAGAGG
CTGGCAACTGAGTTACATCAGTACAAGAGCCACGAGGGCTTTGGGTTTGAGGTTCCGACTTTTGTGGAGCAACGCGTCAGAGGAAT
GGCTGGTATACAACCTTGGGAGCAATGCTACAGTAATTTGATAGGGAATCTGCTAGATGGTCTGTCTCGACGAGAGTATGGCGCTCTC
TGACGAAGGGAGAAAAGATACGAGAAAGTACGTGCCTTTGACCGACCGAATTGAGATGGCAGCTAATCTAGTTAAAATGAACGCA
AATCAGGGTGATTCCCAGTTGCTTGGTACGAGAGTACAGTCTCGTTATGTCTTTCTTGA
```

Figure S2– Sequences of the five *frk* allelic forms carried by the six nuclei of the three *A. bisporus* var. *bisporus* wild strains Bs177 (*frk1/frk1*), Bs243 (*frk2/frk3*) and Bs256 (*frk4/frk5*) (a-e); sequence of the *frk* gene in sporocarps S10, S11 and S17 from combination Db 243/Rm 256 (f-h). The polymorphic SNP allowing discrimination between the allelic forms are framed in colors. Sequence of 5' region of *frk* gene in sporocarp S10 shows a pairing of the allele *frk3* and *frk4* from strains Bs243 and Bs256, respectively whereas in sporocarp S11 this sequence represent 100% of nt identity with the orthologous one in the recipient strain Bs256. Sequence of *frk* marker in sporocarp S17 shows a pairing of the allele *frk2* of strain Bs243 and allele *frk4* of Bs256

**Chapitre 5: Implantation et suivi du comportement
biologique de souches d'*Agaricus bisporus* dans leur
milieu naturel, la litière de cyprès**

I- Introduction

Dans les populations sauvages d'*A. bisporus*, la succession de générations soumises à un cycle biologique majoritairement pseudohomothallique devrait aboutir à des lignées pseudoclonales (Kerrigan, 1990). Cependant, peu d'évidences de l'existence de tels clones indicateurs d'un cycle pseudohomothallique ont été trouvées lors de l'analyse de la structure de différentes populations sauvages (Xu et al 2002, 2013), suggérant que les croisements et les événements de recombinaison associés joueraient un rôle important dans l'histoire de ces populations naturelles.

L'étude des populations d'*A. bisporus* dans leur environnement naturel est compliquée par le caractère imprévisible de l'apparition de sporocarpes de nature éphémère. En effet, les sporocarpes de cette espèce ne sont qu'occasionnellement rencontrés et, en conséquence, les densités de spécimens récoltés pour l'étude des populations sont généralement faibles, en comparaison avec d'autres basidiomycètes (Kerrigan et al. 1993a). Cette étude est également compliquée par la rareté des épisodes de production de sporocarpes en grand nombre chez cette espèce. Par exemple, en Californie, une production abondante de sporocarpes sur le terrain n'a été rapporté que deux fois en 15 années d'observation (Kerrigan et al. 1993a).

Dans ce contexte, la mise en évidence d'évènements de croisements entre souches présélectionnées survenant dans un laps de temps court et dans un habitat naturel permettrait une réévaluation du potentiel d'hybridation génétique d'*A. bisporus*.

Au cours de cette thèse, nous avons donc choisi d'implanter des souches sauvages d'*A. bisporus* dans leur habitat naturel, la litière de cyprès (*Cupressus macrocarpa*) afin de répondre aux nombreuses questions posées sur le comportement reproductif des souches, l'évolution spatio-temporelle des populations et les processus dynamiques susceptibles de générer et modifier leur structure génétique.



Figure 5-1- Photographie d'une des parcelles expérimentales de cyprès du domaine INRA de Bourran (Dept. 47) et d'un cyprès au moment de l'implantation des souches d'*A. bisporus*

L'expérimentation menée visait, en particulier, à comprendre les rôles respectifs des spores homocaryotiques (liées à l'hétérothallisme), des spores hétérocaryotiques (liées au pseudohomothallisme) et des fragments de mycélium (reproduction végétative) dans l'envahissement d'un biotope naturel, dépourvu (en apparence) de souches d'*A. bisporus* indigènes.

Le suivi des souches implantées devrait également permettre de mieux comprendre les rôles respectifs et l'importance relative des divers modes de reproduction: reproduction végétative (qui conduit à l'établissement de lignées clonales hétérocaryotiques); reproduction sexuée de souches homothalliques (conduit à des lignées clonales homocaryotiques); reproduction sexuée de souches pseudohomothalliques (conduit à des lignées pseudoclonales hétérocaryotiques) ou hétérothalliques (croisements entre homocaryons, recombinaison); ou reproduction via des procédés parasexuels tels que le phénomène de Buller (croisement entre un noyau issu d'un mycélium homocaryotique et un noyau issu d'un mycélium hétérocaryotique).

Pour cela, en Novembre 2000, deux parcelles expérimentales de 57 m x 32 m, distantes de 50 m environ, ont été plantées chacune avec 106 jeunes plants de cyprès (provenant de la germination de graines et élevés en jardinerie). Les parcelles étaient situées à Bourran (domaine expérimental de l'INRA en Aquitaine, Dept 47) et étaient éloignées de toutes sources connues de spores d'*A. bisporus* (à la fois en ce qui concerne des sources de populations sauvages indigènes et aussi des lieux de culture de variétés industrielles ou cultivars). Après 12 années de croissance des cyprès sur les parcelles, un certain nombre de plants sont morts (maladies et aléas climatiques) et le nombre total d'arbres a diminué à 77 arbres pour la parcelle 1 et 78 pour la parcelle 2. A ce moment, l'âge et la taille des arbres (Fig. 5-1) ainsi que la quantité de litière produite sur le sol à leur pied ont été estimés suffisants pour débiter l'implantation de souches d'*A. bisporus* dans le cadre d'une étude de suivi des populations à court mais aussi long terme.

Pour l'inoculation des parcelles expérimentales, seules des souches françaises ont été sélectionnées, afin de minimiser un éventuel processus d'invasion par des souches d'origines géographiques éloignées, en provenance, par exemple d'un autre continent.

II- Matériels et Protocoles expérimentaux

II-1- Caractérisation de mycelia présents dans les litières de cyprès avant l'implantation

Avant implantation des souches sélectionnées, des échantillons de litière ont été prélevés aux sites d'implantation et étudiés par des approches microbiologiques et moléculaires.

II-1-1- Approche microbiologique

II-1-1-1- Isolation de colonies mycéliennes à partir de la litière

10 g de chaque échantillon de litière analysé ont été mélangés avec 180 ml d'une solution de dispersion (1,2 g de bactopeptone, 6 g de pyrophosphate de sodium dans 1000 ml d'H₂O). Le mélange a été agité dans un mélangeur à bol pendant 2 x 10 s. 200 ml d'eau distillée ont été ajoutés et l'ensemble agité 10 secondes dans un bol mélangeur. La suspension a été utilisée pour réaliser des dilutions en série 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} dans la même solution dispersante. Pour chaque dilution, trois répliques ont été faites. A l'aide d'une pipette Duclaux, 0,05 ml de chaque répétition a été pris et étalé dans des boîtes de Petri sur du milieu solide malt agar (Promega, Madison, Wisconsin, USA) contenant un cocktail d'antibiotiques (Chortetracycline, Sulfate de streptomycine, Pénicilline) afin d'empêcher la croissance des bactéries contaminantes. Les boîtes de Petri ont été incubées à 25 ° C. Les colonies ont été repiquées sur du milieu solide, au fur et à mesure de leur apparition sur les boîtes d'étalement.

II-1-1-2- Extraction d'ADN, PCR, séquençage et analyse des séquences

20 à 200 mg de mycélium ont été prélevés, à partir des colonies isolées sur le milieu de culture, à l'aide d'un scalpel. L'extraction de l'ADN de ces colonies a été réalisée par la méthode « miniprep » CTAB décrite par Barroso et al. 1995. Les PCR utilisées pour l'amplification de la région ITS1/5.8S/ITS2 ont été réalisées à l'aide du couple d'amorces ITS5/ITS4 (White et al. 1990) en utilisant l'ADN polymerase GoTaq® (Promega, Madison, WI, USA) comme suit: 95 ° C pendant 5 min, 35 cycles de [95 ° C pendant 30 s, 54 ° C pendant 30 s, 72 ° C pendant 1 min], 72 ° C pendant 5 min. Les produits de PCR obtenus ont été analysés par électrophorèse dans un gel d'agarose puis séquençés par la société Cogenics- Genome Express (Grenoble, France). L'alignement de séquences multiples a été réalisée à l'aide du logiciel CLUSTALW (Thompson et al. 1994) et leur comparaison avec celles de la GenBank réalisée à l'aide du logiciel BLASTn (Altschul et al. 1990).

II-1-2- Approche moléculaire

II-1-2-1- Extraction d'ADN et amplification par PCR

En parallèle avec l'approche microbiologique, un g de chaque échantillon de litière est broyé dans un mortier avec un pilon, en présence continue d'azote liquide. L'ADN du broyat réduit en fine poudre est alors extrait selon la méthode Maxiprep CTAB décrite par Noël et Labarère 1987. Les PCR des régions ITS sont réalisées comme décrit ci-dessus.

II-1-2-2- Préparation de bactéries *Escherichia coli* XL1-blue chimio-compétentes

Le protocole utilisé est celui décrit par Hanahan (1983). Les bactéries de la souche *E. coli* XL1-blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]) (Bullock et al. 1987) ont été cultivées dans du milieu LB liquide (10 g Bactopeptone, 15

g d'extrait de levure, 5 g de NaCl dans 1 litre d'H₂O). 250 µl d'une pré-culture en phase stationnaire (16h, 37°C, avec agitation) servent à ensemer 25 ml de milieu LB liquide contenant 25 µg / ml de tétracycline. Les cellules sont cultivées à 37 ° C avec agitation (250 rpm) jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 0,6 (phase exponentielle de croissance), les cellules sont alors récupérées par centrifugation (2700 g, 4 ° C, 15 min). Les culots sont alors remis en suspension dans 16 ml de tampon RF1 (RbCl 10mM, MnCl₂ 4 H₂O 45 mM, Acétate de K 30 mM, CaCl₂ 2H₂O 10 mM, 15% glycérol (v/v), pH = 5,8) stérilisé par filtration sur un filtre Millipore 0.45µ et conservé à 4 ° C. Après deux heures d'incubation à 4°C, la culture bactérienne est centrifugée (2700 g, 4 ° C, 15 min). Le culot est remis en suspension dans 5 ml de tampon RF2 (MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 2H₂O 75 mM, 15% glycerol (p/v), pH = 6,8) stérilisé par filtration sur filtre Millipore 0.45 µ.

II-1-2-3- Transformation des bactéries chimio-compétentes

Les produits de PCR sont introduits dans un plasmide vecteur pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, USA) selon les instructions du fabricant (Promega, Madison, WI, USA) en utilisant l'ADN ligase du bactériophage T4. Les réactions sont réalisées pendant une nuit à température ambiante. La transformation a été réalisée comme suit: 2 µl du mélange de ligation ont été mélangés avec 100 µl de bactéries chimio-compétentes et l'ensemble est incubé à 4 ° C pendant 30 min, puis soumis à un choc thermique à 42 ° C pendant 90 s puis refroidi brutalement dans de la glace (4°C). Un ml de milieu LB liquide est alors ajouté et l'ensemble est incubé à 37 ° C pendant 30 min. 100 µl sont alors étalés sur du milieu LB solide contenant 50 µg / ml d'ampicilline. Après une nuit d'incubation à 37 ° C, les colonies bactériennes blanches sont transférées individuellement dans 5 ml de milieu LB liquide contenant 50 µg / ml d'ampicilline et incubées à 37 ° C avec agitation pendant 16 heures.

Tableau 5-1- Nom et origine des souches et espèces d'*Agaricus* utilisées pour l'implantation des parcelles expérimentales

Espèce et variété	Nom de la souche	Mode de vie	Origine géographique
<i>A. bisporus</i>			
var. <i>bisporus</i>	Bs177	Heterokaryotic	Lorient (France)
	Bs240	Heterokaryotic	Lorient (France)
	Bs243	Heterokaryotic	Lorient (France)
	Bs254	Heterokaryotic	Saint- Malo (France)
	Bs256	Heterokaryotic	Saint- Malo (France)
var. <i>eurotetrasporus</i>	Bs423	Homokaryotic	La Rochelle (France)
<i>A. subrefescens</i>	CA643	Heterokaryotic	Gironde, Le pian médoc (France)

II-1-2-4- Extraction des plasmides et hydrolyse enzymatique par des endonucléases de restriction

L'extraction des plasmides recombinants contenus dans les clones bactériens blancs a été réalisée en utilisant le kit de purification de l'ADN plasmidique « Wizard® plus SV minipreps DNA purification system », selon les instructions du fournisseur (Promega, Madison, WI, USA). La digestion des plasmides a été réalisée comme suit: 150 à 300 ng de plasmide, 2 µl de tampon de réaction 10X, 1 µl de l'endonucléase de restriction dans un volume final de 20 µl.

II-2- Préparation des inocula fongiques à partir des souches d'*A. bisporus* sélectionnées

II-2-1- Souches, milieux et conditions de culture

Pour préparer les inocula d'implantation sur les parcelles, cinq souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* dont Bs177, Bs240 et Bs243 de Lorient, Bs254 et Bs256 de Saint-Malo, une souche d'*A. bisporus* var. *eurotetrasporus*: Bs423 et une souche de l'espèce *A. subrefescens* CA643 (Tableau 5-1) ont été repiquées sur 60 boîtes de Petri (diamètre 90mm) contenant du milieu solide CYM (Raper et al. 1972) additionné de 0,1% d'extrait de compost commercial (phase II). Les mycelia ont été cultivées pendant 14 jours à 25 ° C.

La souche d'*A. bisporus* var. *eurotetrasporus* Bs423 a été ajoutée aux souches initialement sélectionnées car elle représente une souche française (La Rochelle, Dept. 17) dotée d'un cycle biologique particulier. En effet, cette souche est une souche homothallique haploïde. Elle a été placée dans une région éloignée des sites d'implantation des souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* impliquées dans l'expérimentation principale. De même, La souche française CA643 d'*Agaricus subrefescens* (Montalivet, Dept. 33) a été introduite dans une région de la parcelle isolée du site d'expérimentation principale afin de tester si la présence de cette espèce, déjà rencontrée dans la nature sous cyprès en compagnie d'*A. bisporus*, était susceptible de favoriser

l'apparition et/ou la croissance de souches d'*A. bisporus* dans les secteurs proches de son site d'implantation.

II-2-2- Préparation des inocula d'implantation dans du compost commercial

Pour chaque souche, 15 bacs contenant 850 g de compost commercial (société Renaud, France) ont été inoculés avec les colonies mycéliennes préalablement cultivées sur du milieu CYM solide supplémenté par 1 % d'extrait de compost. Pour cela, la surface de chaque bac a été recouverte par le milieu solide envahi provenant de 4 boîtes de Petri (diamètre 90 mm). L'envahissement du compost est obtenu par l'incubation des bacs dans une chambre de culture pendant 14 jours à une température de 25 °C et une humidité relative de l'air de 85%.

A l'issue de cette phase d'envahissement, le compost est maintenu dans la chambre de culture sans régulation de la température et de l'humidité durant trois jours, afin de permettre une adaptation progressive des mycélia aux conditions climatiques environnementales.

II-3- Implantation des inocula d'*A. bisporus* dans les parcelles expérimentales

Au cours des manipulations d'introduction des souches, des précautions ont été prises afin d'éviter le transport de débris de mycélium d'un site d'introduction à l'autre. Les premières étapes (déplacement de la litière et creusement des trous) ont eu lieu le jour avant l'introduction (J-1), en l'absence des inocula. Pour la mise en place des blocs de compost, des gants stériles ont été utilisés et chaque souche a bénéficié d'un expérimentateur spécifique.

Les paramètres climatiques locaux du site INRA de Bourran ont été enregistrés et les parcelles ont été équipées de sondes à boutons placées à proximité des points d'inoculation permettant ainsi un enregistrement journalier de l'humidité et des variations de température. Comme les parcelles expérimentales étaient situées à 200 Km du laboratoire, Une visite quotidienne des sites d'implantation était réalisée par du personnel INRA présent en permanence

sur le site. Des visites régulières des parcelles expérimentales étaient effectuées au moins une fois par semaine pendant les périodes où les conditions climatiques étaient favorables à la fructification.

II-4- Prélèvement d'échantillons de sporocarpes, extraction d'ADN, PCR, séquençage et analyse des séquences

Sur chacune des parcelles expérimentales, la localisation précise de chaque sporocarpe différencié a été notée. Pour chaque sporocarpe, un échantillon constitué par un fragment cubique de 5 mm de côté a été prélevé au niveau du chapeau et la date du prélèvement a été notée.

L'extraction de l'ADN de chaque échantillon a été réalisée par la méthode « miniprep » CTAB décrite précédemment. L'amplification de la région de l'intron *iAbi11* du gène *coxI* a été réalisée avec les amorces i11U/i11R (Jalalzadeh et al. 2014) et l'ADN polymérase GoTaq® (Promega, Madison, WI, USA) comme suit: 95 ° C pendant 5 min, 35 cycles de [95 ° C pendant 30 s, 50 ° C pendant 30 s, 72 ° C pendant 3 min], 72 ° C pendant 10 min. L'amplification de la région ITS a été réalisée avec les amorces ITS5 / ITS4 (White et al. 1990) comme suit: 95 ° C pendant 5 min, 35 cycles de [95 ° C pendant 30 s, 54 ° C pendant 30 s, 72 ° C pendant 1 min], 72 ° C pendant 5 min. De la même façon, l'amplification du gène *frk* a été réalisée avec les amorces PR6U/PR6R (Imbernon et al. 1996) comme suit: 95 ° C pendant 5 min, 35 cycles de [95 ° C pendant 30 s, 58 ° C pendant 30 s, 72 ° C pendant 1 min], 72 ° C pendant 5 min. La digestion des produits d'amplification a été effectuée en utilisant l'endonucléase de restriction *HaeIII* selon les recommandations du fournisseur (Promega, madison, WI, USA). Le séquençage des produits de PCR a été réalisé par Cogenics - Genome Express (Grenoble - France). L'alignement des séquences a été réalisé à l'aide du logiciel CLUSTALW (Thompson et al. 1994).

Tableau 5-2- Espèces fongiques détectées dans les échantillons de litière par l'approche microbiologique

Morphotype de la colonie	Espèce identifié	Ordre	Accession N°	Score total (blastn)	E value	Litière d'origine de la colonie	Echantillon(s) présentant le morphotype
1	<i>Allantophomopsis lycopodina</i>	Ascomycetes	JX981469.1	977	0.0	L3	L3
2	<i>Leptosphaeria</i> sp.	Ascomycetes	AY336132.1	939	0.0	L1	L1
3	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Ascomycetes	HQ832794.1	985	0.0	L2	L2, L4
4	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Ascomycetes	HQ832794.1	985	0.0	L4	L4
5	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	Ascomycetes	JX496058.1	1085	0.0	L3	L3
6	<i>Epicoccum nigrum</i>	Ascomycetes	KC867291.1	972	0.0	L4	L4, L1
7	<i>Fusarium oxysporum</i>	Ascomycetes	KC196121.1	1005	0.0	L1	L1
8	<i>Elaphocordyceps</i> sp.	Ascomycetes	KC237381.1	1031	0.0	L2	L2
9	<i>Beauveria bassiana</i>	Ascomycetes	KC753398.1	1018	0.0	L2	L2
10	<i>Chaetopsina beijingensis</i>	Ascomycetes	KJ869159.1	1033	0.0	L3	L1, L2, L3
11	<i>Penicillium scabrosum</i>	Ascomycetes	KM023349.1	1037	0.0	L2	L2, L3
12	<i>Penicillium sacculum</i>	Ascomycetes	KJ028785.1	1048	0.0	L4	L4
13	<i>Mucor circinelloides</i>	Zygomycetes	GU966516.1	1144	0.0	L2	L1, L2, L4

III- Résultats: Sélection, introduction et suivi des souches sauvages d'*A. bisporus* dans les parcelles expérimentales de cyprès

III-1- Etude préliminaire des espèces fongiques présentes dans la litière de cyprès des parcelles avant introduction des souches d'*A. bisporus*

Avant l'introduction de souches sélectionnées d'*A. bisporus* dans les parcelles expérimentales, nous avons cherché à vérifier l'absence de mycélium de cette espèce dans la litière de cyprès, en utilisant deux approches différentes: l'une microbiologique et l'autre moléculaire.

L'approche microbiologique était basée sur l'isolation sur un milieu sélectif (avec antibiotique) des colonies mycéliennes provenant de quatre prélèvements différents de litière. Ces échantillons de litière (10 g) ont été prélevés en surface dans quatre sites répartis sur l'ensemble de la parcelle L2 (nommés L1, L2, L3 et L4) et qui présentaient un envahissement important des aiguilles de cyprès constituant cette litière par de nombreux filaments mycéliens blanchâtres visibles à l'œil nu.

L'étalement des dilutions a montré la présence de nombreuses colonies mycéliennes (environ 10^6 colonies par gramme de litière). Sur l'ensemble des quatre prélèvements, une analyse du phénotype des différentes colonies mycéliennes a permis de différencier 13 colonies montrant des morphologies différentes. Pour chaque type morphologique, une colonie a été sélectionnée et isolée après repiquage sur du milieu nutritif. Son ADN a été extrait et une amplification de la région ITS1/5.8S/ITS2 réalisée. Le produit de PCR a été séquencé et la séquence obtenue comparée aux séquences de la GenBank, à l'aide du logiciel Blastn (Altschul et al. 1990), afin de déterminer le nom de l'espèce fongique correspondante ou les organismes phylogénétiquement reliés les plus proches. Dans ce dernier cas, l'analyse des séquences a permis de déterminer le genre de l'espèce représentée par la colonie isolée. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 5-2. Comme le montre ce tableau, la plupart des colonies étudiées

Tableau 5-3- Espèces fongiques détectées dans les échantillons de litière par l'approche moléculaire

Espèce	Ordre	Accession N°	Score total (blastn)	E value	Litière d'origine
Mycosphaerellaceae souche non cultivée	Ascomycetes	FJ553102.1	918	0.0	L2
Pleosporales souche non cultivée	Ascomycetes	DQ182451.1	763	0.0	L4(1)
<i>Gyrothrix circinata</i>	Ascomycetes	KC775744.1	797	0.0	L1(1), L3(5), L4(1)
<i>Chaetopsina beijingensis</i>	Ascomycetes	KJ869159.1	671	0.0	L2(1)
<i>Helicodendron websteri</i>	Ascomycetes	EF029229.1	850	0.0	L4 (1)
<i>Phlebiella christiansenii</i>	Basidiomycetes	EU118659.1	990	0.0	L1(4), L2(3), L4(2)

appartenaient à la division des Ascomycota, à l'exception d'un zygomycota attribué à l'espèce *Mucor circinelloides*. Aucune colonie mycélienne de Basidiomycota (et donc d'*Agaricus sp.*) n'a été mise en évidence par cette approche microbiologique, vraisemblablement en rapport avec la faible vitesse de croissance des filaments mycéliens de ces organismes. Certaines colonies représentent des espèces communes retrouvées dans les étalements de plusieurs (deux ou trois) des quatre échantillons de litière. D'autres n'ont été retrouvées que dans un seul des quatre échantillons. Il faut noter que deux échantillons donnant des colonies mycéliennes morphologiquement différentes et provenant de deux échantillons de litière différents ont été désignés comme appartenant à la même espèce *Cladosporium cladosporioides*, ce qui pourrait être expliqué par un polymorphisme de cette espèce au niveau de la morphologie des colonies.

En ce qui concerne l'approche moléculaire, l'ADN total présent dans 1 g de chacun des quatre échantillons de litière utilisés pour l'approche microbiologique décrite ci-dessus a été extrait. Cet ADN total (100 ng) a été soumis à une amplification de la région ITS1/5.8S/ITS2 par PCR. Les produits d'amplification correspondant aux quatre échantillons ont été clonés séparément dans *E. coli* à l'aide du vecteur pGEM-T-easy. Pour chaque échantillon (L1, L2, L3 et L4), les inserts portés par cinq plasmides recombinants ont été séquencés et les séquences soumises à une comparaison de séquences avec la GenBank (logiciel Blastn). Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 5-3. L'analyse des 20 régions ITS clonées a révélé dans l'ensemble des échantillons, l'existence de six espèces fongiques différentes. Parmi ces six espèces, cinq appartenaient à la division des Ascomycota et une à la division des Basidiomycota : *Phlebiella christiansenii*. Cette dernière espèce représentait presque la moitié des séquences analysées (9/20) et est retrouvée dans trois des quatre échantillons de litière, ce qui suggère une présence prédominante de ce Basidiomycota dans le biotope que constitue la litière de cyprès mais qu'il s'agirait d'un Basidiomycota difficile à isoler sur le milieu sélectif utilisé lors de l'approche microbiologique et davantage adapté à la culture d'Ascomycota. De la même façon,

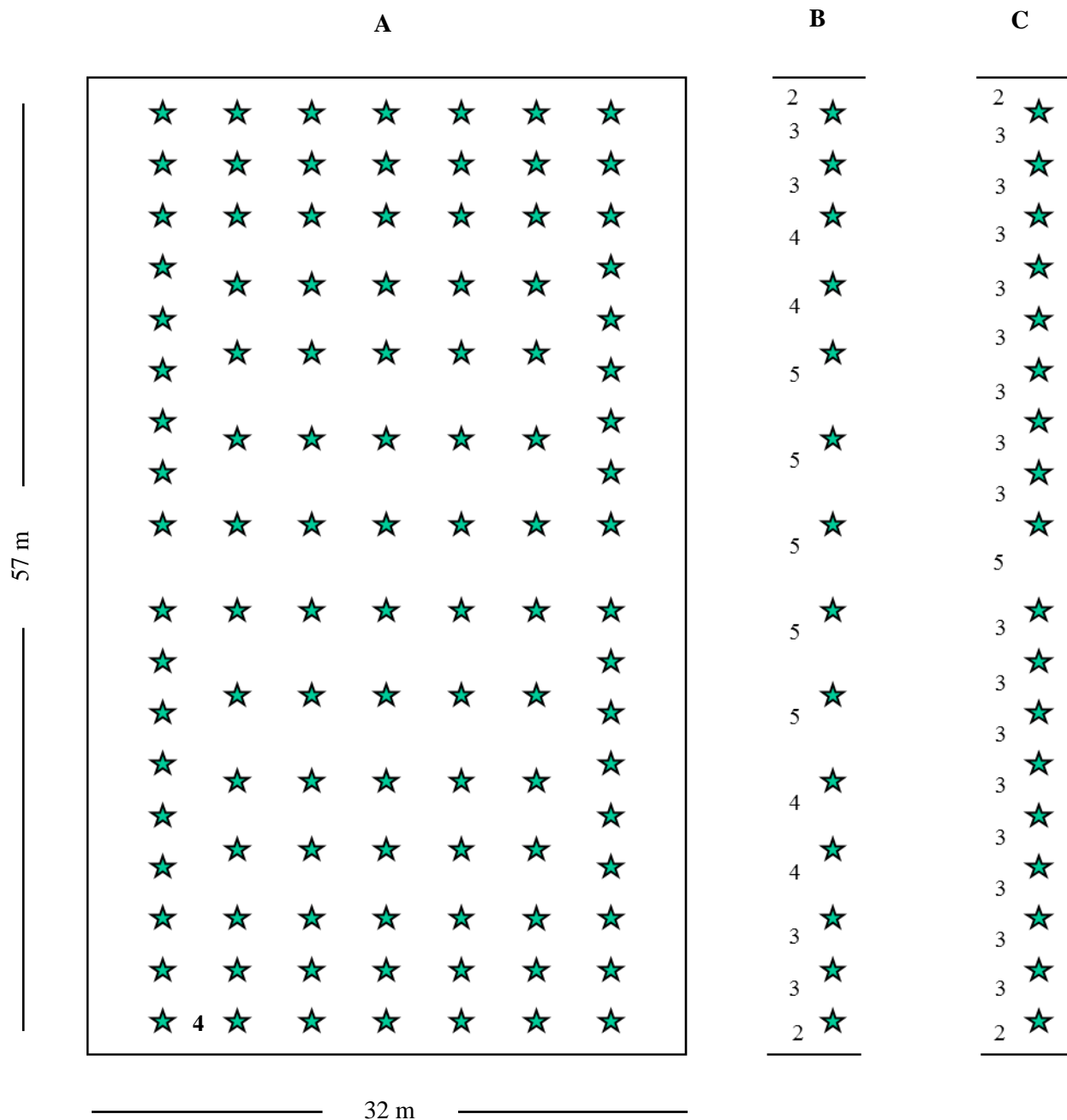


Figure 5-2- Représentation schématique des sites de plantation des arbres dans les deux parcelles de cyprès, distantes de 50 m. Chaque parcelle mesure 57 m x 32 m et 106 arbres y ont été plantés. La distance entre deux arbres d'une même ligne horizontale est constante et égale à 4 m (A); la distance entre deux arbres situés sur une même ligne verticale varie de 2 à 5 m, comme indiqué en B et C pour les rangées intérieures et extérieures (bordures), respectivement

parmi les cinq espèces d'Ascomycota, l'une, *Gyrophthrix circinata* est très présente (7 séquences répartis dans trois échantillons). Les quatre autres sont retrouvées dans un ou deux des échantillons et il faut noter que l'une d'elle *Chaetopsina beijingensis* avait déjà pu être mise en évidence à partir de l'analyse microbiologique.

L'ensemble des conclusions tirées de ces résultats issus tant de l'approche microbiologique que de l'approche moléculaires doivent cependant être fortement nuancées pour tenir compte à la fois de la faiblesse du nombre d'échantillons de litière analysés (4) et du nombre de séquences déterminées à partir de ces échantillons (13 colonies et 20 clones).

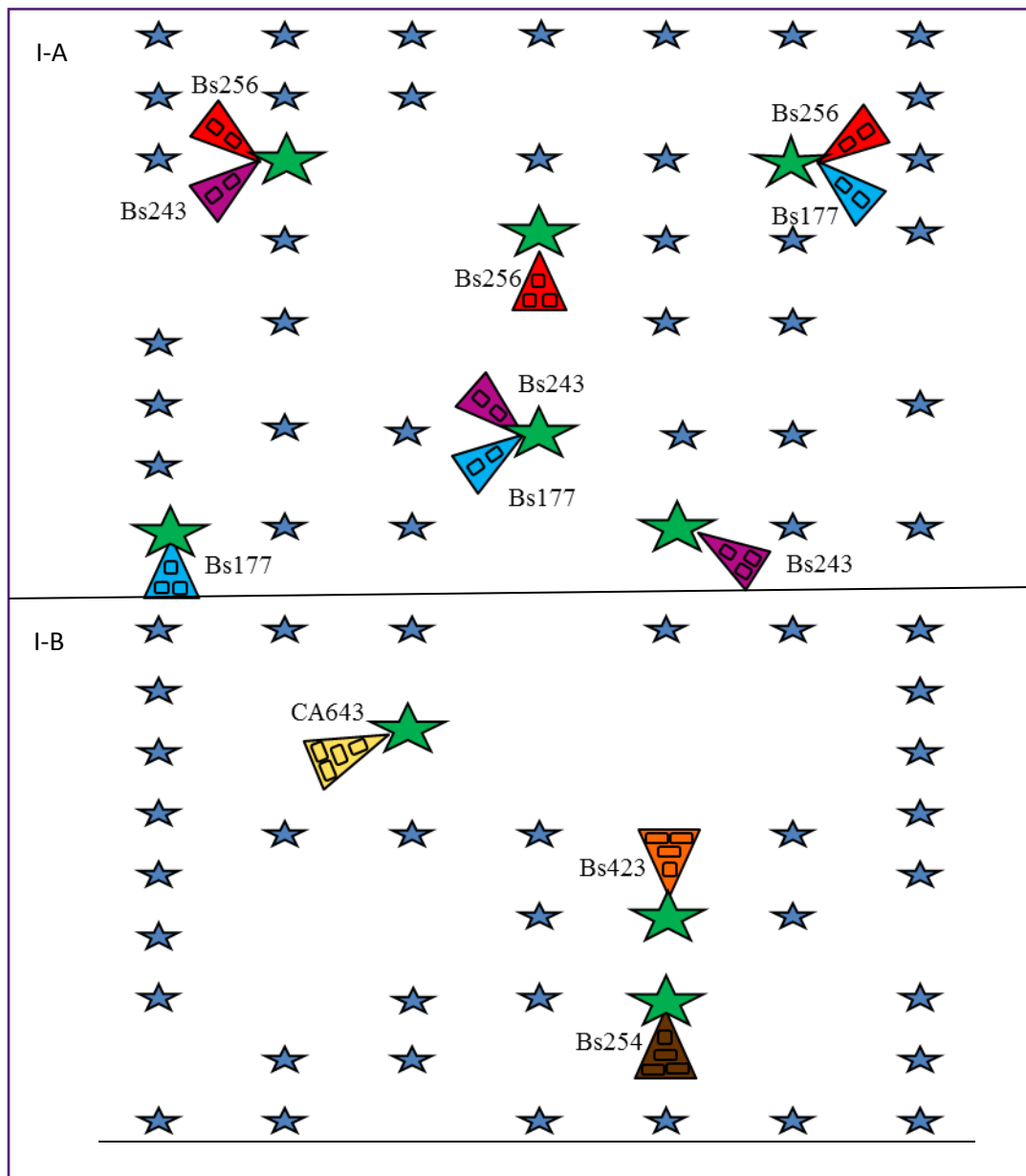
Au total, 17 espèces fongiques différentes (1 Zygomycota, 15 Ascomycota et 1 Basidiomycota) ont pu être détectées dans la litière. Certaines espèces paraissent fortement représentées car présentes dans les analyses de trois des quatre échantillons comme le Basidiomycota *Phlebiella christiansenii*, le Zygomycota *mucor circinelloides* et l'Ascomycota *Chaetopsina beijingensis*.

Il faut noter qu'aucune évidence de la présence d'une espèce appartenant au genre *Agaricus* n'a pu être obtenue dans les échantillons prélevés.

III-2- Introduction des inocula d'*A. bisporus* dans les parcelles expérimentales

L'implantation des inocula dans les deux parcelles de cyprès a été réalisée le 23 Novembre 2012. La figure 5-2 montre la représentation schématique des arbres plantés sur les deux parcelles expérimentales, séparées par une distance d'environ 50 m. Les sites d'introduction des inocula fongiques sont représentés sur le schéma de la figure 5-3. Il faut noter que sur ce schéma, seuls les arbres vivants en Novembre 2012 sont indiqués. Dans la partie supérieure du schéma de chaque parcelle (Fig. 5-3, parcelle I-A et II-A), trois souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* Bs177, Bs243 et Bs256 ont été disposées soit (1) de manière isolée c'est-à-dire séparées par une distance minimale entre deux souches de 6 m (cette distance varie, en fait selon le site

a.



b.

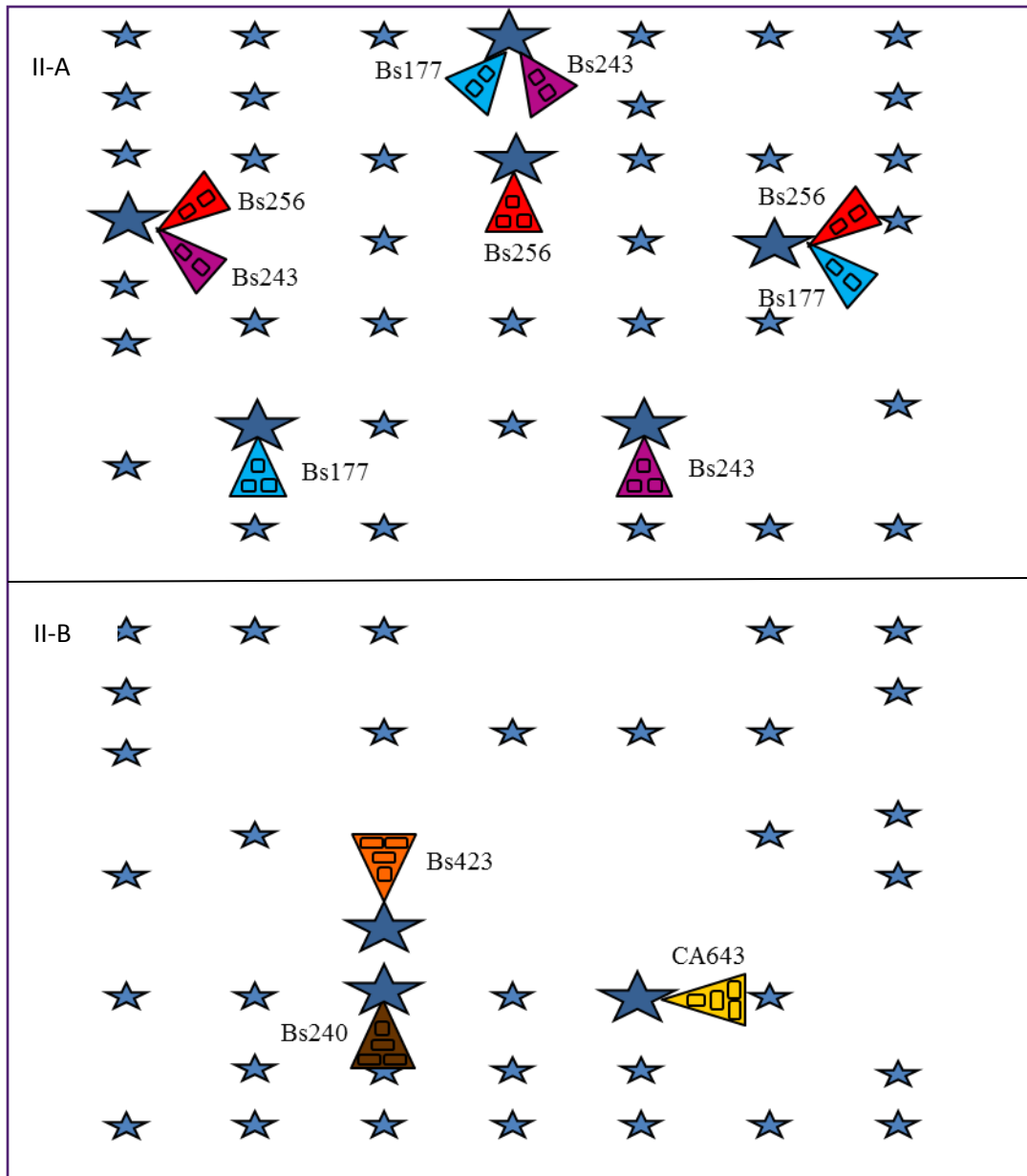


Figure 5-3- Représentation schématique des parcelles expérimentales I (a) et II (b). Les arbres présents en novembre 2012 sont représentés par des étoiles. Les sites d'inoculations des souches d'*Agaricus*, aux pieds des cyprès sont schématisés par des triangles contenant les blocs de compost envahis (= inoculats). Les couleurs des triangles correspondent aux différentes souches introduites : Rouge : *A. bisporus* var. *bisporus* Bs256, Violet : *A. bisporus* var. *bisporus* Bs243, Bleu : *A. bisporus* var. *bisporus* Bs177, Orange: *A. bisporus* var. *eurotetrasporus* Bs423, Marron: *A. bisporus* var. *bisporus* Bs254 (parcelle I) ou Bs240 (parcelle II), jaune : *A. subrufescens* CA643

a.



b.



c.



d.



Figure 5-4- différentes étapes de l'introduction des inocula fongiques dans les parcelles: déplacement de la litière et creusement du sol (a) le premier jour; mise en place des blocs de compost ou inocula (b); ajout de la terre de gobetage (c); recouvrement de la surface avec la litière et marquage des sites (d)

d'introduction et la souche entre 6 et 12 m), soit (2) en couples (deux souches introduites dans la litière au pied d'un même arbre et séparées par une distance inférieure à 1m).

Pour chaque site d'introduction, la couche de litière a été mise de côté afin de creuser à l'aide d'une pelle un trou correspondant au volume total des inoculas (2 blocs d'inocula soit 2 x 850 g de compost envahi pour les souches disposées en couples et 3 blocs pour les souches en position isolée, cf. Fig. 5-3). Les inocula ont alors été introduits dans les trous creusés et recouverts par 2 cm de terre de gobetage (mélange sable, tourbe et chaux dans des proportions 1/1/1 (v/v/v), préalablement autoclavé à 121°C pendant 1 heure). L'ajout de la terre de gobetage avait pour but d'induire une fructification précoce des mycélia introduits. Les sites d'introduction ont finalement été recouverts par la litière initialement déplacée et repérés à l'aide de piquets étiquetés et d'un marquage au sol. Ces différentes étapes sont photographiées sur la figure 5-4.

Une autre expérience a été mise en place. Elle consistait à implanter, dans une région éloignée de l'expérience principale, une autre souche d'*A. bisporus* var. *bisporus* (Bs240 pour la parcelle I et Bs254 pour la parcelle II), une souche d'*A. bisporus* var. *eurotetrasporus* (Bs423) et une souche de l'espèce *A. subrufescens* (CA643). Le protocole d'implantation de ces souches est identique à celui décrit pour la partie supérieure de la parcelle, mais quatre blocs de 850 g de compost ont été introduits par souche (cf. Fig. 5-3, parcelles I-B et II-B).

III-3- Caractérisation des sporocarpes d'*A. bisporus* récoltés sur les parcelles, après l'introduction des différentes souches dans les parcelles de cyprès

Suite à l'introduction des souches sélectionnées d'*A. bisporus* dans les parcelles le 23/11/2012 et grâce à des températures relativement douces au cours de l'hiver 2012, les premiers sporocarpes sont apparus au niveau de nombreux sites d'introduction à partir du 08 janvier 2013, soit un mois et demi (J_0+46) après l'introduction. La différenciation de sporocarpes sur ou à proximité des sites d'introduction s'est poursuivie en plusieurs volées successives (deux



Figure 5-5- Photographies de sporocarpes, à différents niveaux de leur développement; du stade primordia au sporocarpie mature, Le chapeau ouvert, suite à la déchirure du voile secondaire expose l'hyménium qui libère les basidiospores à maturité

volées principales) jusqu'en Avril 2013. Durant cette période, une visite hebdomadaire des parcelles a été effectuée. La date d'observation de chaque sporocarpe différencié a été notée et sa localisation marquée sur le terrain à l'aide d'une étiquette (Fig. 5-5). La chronologie d'apparition des sporocarpes sur les parcelles I et II, entre le 08/01, date d'apparition des premiers sporocarpes sur les deux parcelles et le 16/04, date d'apparition des derniers sporocarpes correspondant à une deuxième volée pour de nombreuses souches est indiquée sur la figure de l'annexe S3. Aucun sporocarpe n'a pu être mis en évidence sur les parcelles expérimentales depuis cette date.

Pour chaque sporocarpe ouvert (ayant ainsi exposé sa chambre hyméniale et commencé à émettre des basidiospores matures), un prélèvement d'un petit fragment de chapeau (cube de 5 mm) a été réalisé. 96 échantillons ont ainsi été prélevés.

L'ADN total de 50 de ces échantillons a été extrait (Tableau 5-4). Les échantillons sélectionnés provenaient des parcelles I (25 échantillons) et II (25 échantillons) et des récoltes correspondant à la première volée apparue entre le 08/01 et le 01/02 (7 en parcelle I, 3 en parcelle 2), à la deuxième volée observée entre le 29/03 et le 16/04 (18 en parcelle I, 22 en parcelle 2)

Dans le détail, les échantillons prélevés proviennent des arbres et parcelles suivantes :

- Parcelle I,
 - Volée V1 : arbre A1 souche 243c, (arbre A1 souche 177c) x 2, arbre A2 souche 256c, arbre A3 souche 177c, arbre A3 souche 256c, arbre A8 240i,
 - Volée V2 : (arbre A1 souche 243c) x 2, (arbre A2 souche 243c) x 3, (arbre A4 souche 256i) x 4, (arbre A5 souche 177i) x 2, (arbre A6 souche 243i) x 2, (arbre A7 souche 423c) x 2, (arbre A8 souche 240i) x 2.
- Parcelle II,
 - Volée V1 : arbre B3 souche 177c, arbre B3 souche 256c, arbre B8 souche 254i.

Tableau 5-4- Récapitulatif des profils de digestion par *Hae*III des amplifiats PCR ITS et *frk* ainsi que la caractérisation de l'haplotype mitochondrial à l'aide du marqueur *iAbi11*, constitué par la taille du produit PCR amplifié avec les amorces ciblant l'intron mitochondrial du gène *cox1* pour 48 échantillons de sporocarpes prélevés sur les parcelles

N°	Parcelle	Volée	Souche introduite	profil CAPS	Profil CAPS	Profil de
Echantillon	(arbre)		(Xi ou Xc) ^a	ITS	gène <i>frk</i>	l'intron <i>iAbi11</i>
1	I (A2)	V1 (08/01 au 01/02)	Bs256 c	B	F	L
2	II (B8)	V1 (08/01 au 01/02)	Bs254 i	A	F	S
3	I (A1)	V1 (08/01 au 01/02)	Bs177 c	A	D	S
4	I (A1)	V1 (08/01 au 01/02)	Bs243 c	C	F	0
5	I (A8)	V1 (08/01 au 01/02)	Bs240 i	B	E	L
6	I (A1)	V1 (08/01 au 01/02)	Bs177 c	A	D	S
7	II (B3)	V1 (08/01 au 01/02)	Bs177 c	A	D	S
8	II (B3)	V1 (08/01 au 01/02)	Bs256 c	B	F	L
9	I (A2)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs243 c	C	F	0
10	II (B3)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs256 c	B	F	L
11	I (A8)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs240 i	B	E	L
12	II (B8)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs254 i	A	F	S
13	II (B3)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs177 c	A	D	S
14	II (B8)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs254 i	A	F	S
15	II (B3)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs177 c	A	D	S
16	II (B7)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs423 i	A	D	L
17	II (B7)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs423 i	A	D	L
18	I (A4)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs256 i	B	F	L
19	II (B3)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs256 c	B	F	L
20	I (A2)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs243 c	C	F	0
21	I (A1)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs243 c	C	F	0
22	II (B1)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs243 c	C	F	0
23	II (B6)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs243 i	C	F	0
24	II (B7)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs423 i	A	D	L

25	I (A2)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs243 c	C	F	0
26	II (B2)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs243 c	C	F	0
27	I (A8)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs240 i	B	E	L
28	II (B7)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs423 i	A	D	L
29	II (B1)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs243 c	C	F	0
30	II (B7)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs423 i	A	D	L
31	II (B6)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs243 i	C	F	0
32	I (A6)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs243 i	C	F	0
33	II (B8)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs254 i	A	F	S
34	II (B4)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs256 i	B	F	L
35	I (A4)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs256 i	B	F	L
36	I (A4)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs256 i	B	F	L
37	I (A6)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs243 i	C	F	0
38	II (B2)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs256 c	B	F	L
39	II (B2)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs243 c	C	F	0
40	I (A1)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs243 c	C	F	0
41	II (B2)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs256 c	B	F	L
42	I (A4)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs256 i	B	F	L
43	II (B2)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs256 c	B	F	L
44	I (A7)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs423 i	A	D	L
45	I (A7)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs423 i	A	D	L
46	I (A7)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs423 i	A	D	L
47	I (A5)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs177 i	A	D	S
48	I (A5)	V2 (29/03 au 16/04)	Bs177 i	A	D	S

^a xi= Souche inoculée en position isolée, xc= souche inoculée en couple

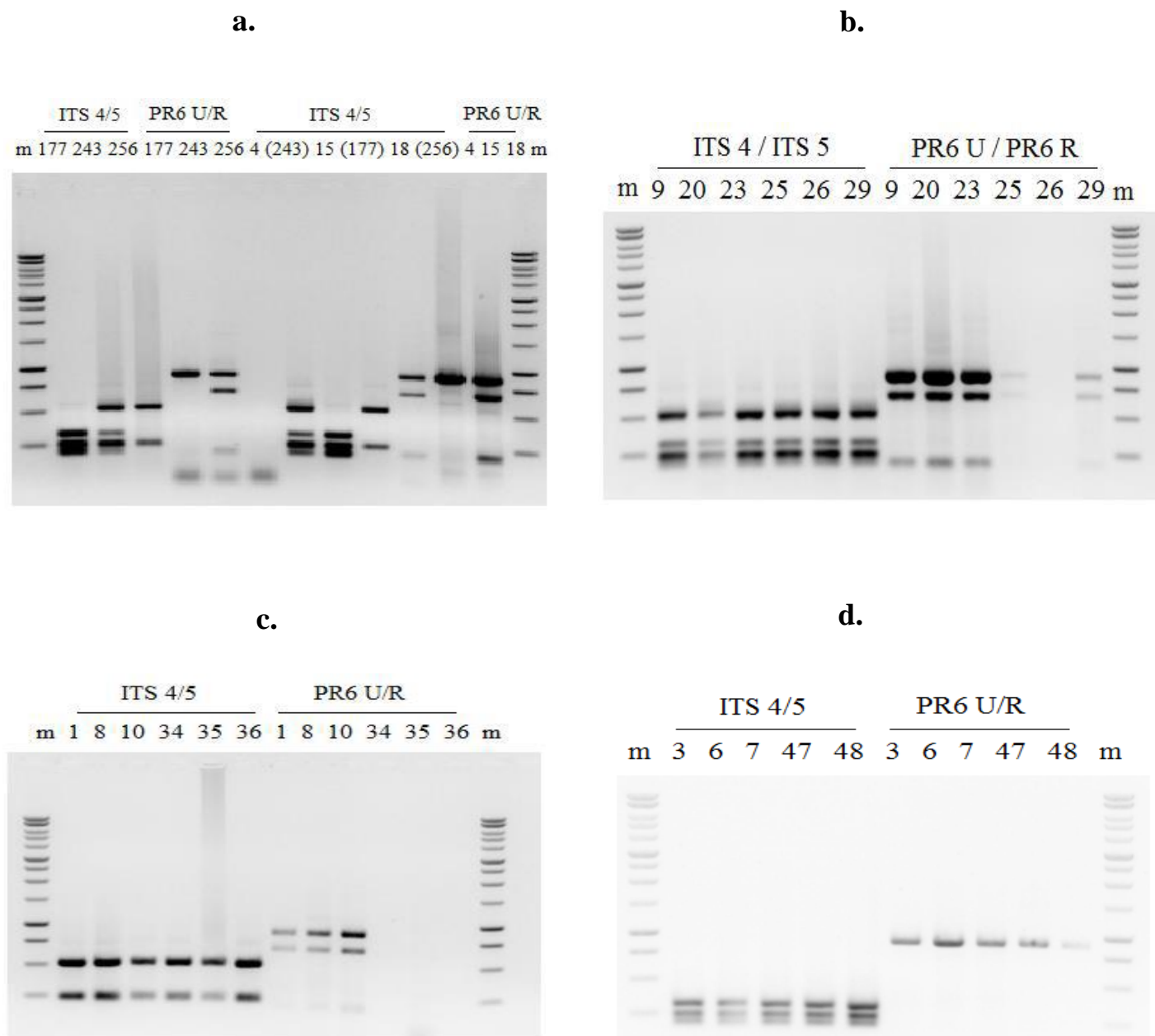


Figure 5-6- Profils électrophorétiques des amplifiats PCR de la région ITS de l'unité ribosomique (amorces ITS4/ITS5) ou de la région 5' du gène *frk* (amorces PR6U/PR6R), après digestion enzymatique par *Hae* III, pour les souches étudiées; Les souches Bs177, BS24, Bs256 et divers échantillons prélevés sur les sporocarpes 4, 15 et 18 (a) ; sporocarpes N° 9, 20, 23, 25, 26 et 29 (b) ; sporocarpes N° 1, 8, 10, 34, 35 et 36 (c) ; sporocarpes N° 3, 6, 7, 47 et 48 (d); A côté de chaque échantillon, le N° entre parenthèses indique le N° codique de la souche implantée initialement au site du prélèvement. M désigne le marqueur de PM 1Kb DNA Ladder (Promega, Madison, WI, USA)

- Volée V2 : (arbre B1 souche 243c) x 2, (arbre B2 souche 243c) x 2, (arbre B2 souche 256c) x 3, (arbre B3 souche 177c) x 2 , (arbre B3 souche 256c) x 2, arbre B4 souche 256i, (arbre B6 souche 243i) x 2, (arbre B7 souche 423i) x 5, (arbre B8 souche 254i) x 3.

Ainsi, les échantillons prélevés et analysés reflètent les sporocarpes différenciés sur l'ensemble des sites d'introduction de souches (arbres A1 à A8 et B1 à B8), soit en première ou en seconde volée. Il faut noter que la souche d'*A. subrufescens* introduite dans la litière des arbres A9 et B9 n'a pas différencié de sporocarpes, de même que la souche Bs177 en position isolée sous l'arbre B5 et en couple sous l'arbre B1, toutes deux dans la parcelle II.

Pour chaque échantillon, les profils électrophorétiques des marqueurs nucléaires correspondant à la région ITS de l'unité ribosomique et au gène *frk* (Fig. 5-6), ainsi que l'haplotype mitochondrial basé sur la région de l'intron *iAbi11* du gène *coxI* (Fig. 5-7) ont été déterminés et rassemblés dans le tableau 5-4. L'analyse de ces résultats a montré que, pour chaque site de prélèvement, les sporocarpes analysés possédaient le même génotype nucléaire et le même haplotype mitochondrial que les souches introduites sur le site du prélèvement.

Ainsi, il apparaît que les sporocarpes récoltés sur les parcelles de cyprès I et II entre le 08/01 et le 16/04 résultent d'un simple événement de fructification des mycéliums hétérocaryotiques introduits. Aucun événement de croisement aboutissant à l'apparition d'une nouvelle souche de type hybride n'a pu être observé dans l'intervalle de temps concerné (soit les six mois suivant l'introduction des souches).

Depuis les deux premières volées, observées dans les six mois suivant l'introduction des souches, aucun sporocarpe n'a été observé sur les deux parcelles expérimentales.

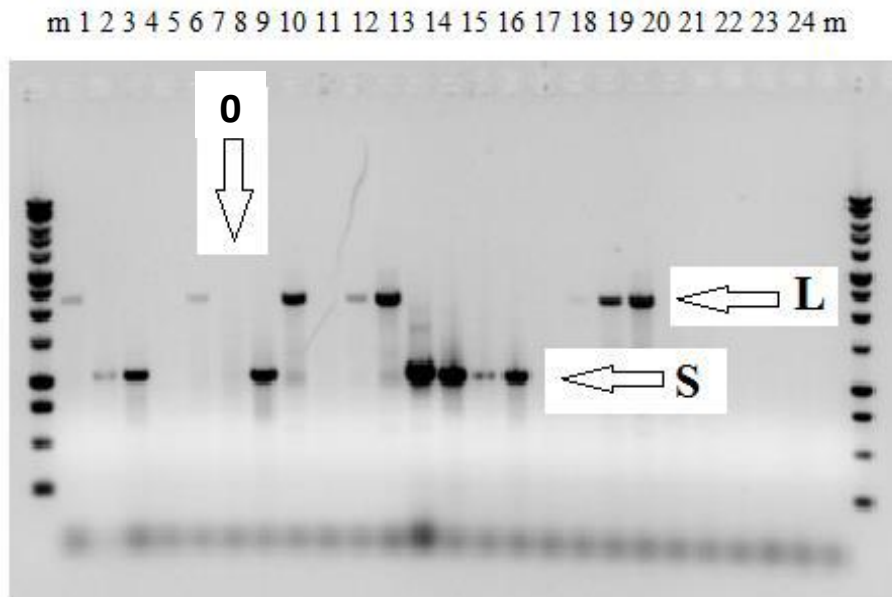


Figure 5-7- Utilisation d'amorces de l'intron *iAbi11* pour caractériser les haplotypes mitochondriaux des échantillons prélevés. (0): Absence de l'intron: pas d'amplification, (L): intron avec ORF mobile (2230 bp), (S): intron sans ORF mobile (987 bp); m représente le marqueur de PM : 1kb DNA ladder (Promega, Madison, WI, USA)

IV- Discussion

L'absence de fructification dans les parcelles expérimentales durant les trois saisons suivantes, pose le problème de la compréhension des mécanismes impliqués dans la différenciation des organes fructifères en milieu naturel. Cet événement semblant, au contraire de ce qui est observé lors de cultures expérimentales où en conditions industrielles, beaucoup plus rare et imprévisible. Ceci conduit à envisager deux hypothèses:

- soit (1) le protocole d'introduction des souches sauvages n'a pas permis d'assurer la survie sur le long terme (2 ans après leur introduction) de ces souches qui auraient donc été éliminées du milieu naturel suite à une pression environnementale pouvant présenter des causes variées (conditions climatiques, compétition avec d'autres organismes fongiques ou autres comme des bactéries, prédation par des nématodes);

- soit (2), les souches introduites sont encore présentes dans la parcelle et les manifestations de leur présence (sous la forme d'organes fructifères aisément détectables) ne se produiront que de façon rare et sporadique. Cette deuxième hypothèse nécessite la surveillance sur le long terme de la parcelle et, en parallèle, le développement d'outils performants de détection des souches introduites dans la litière de cyprès.

Ces éléments devraient permettre d'utiliser les outils et dispositifs mis en place au cours de cette thèse pour comprendre l'évolution spatio-temporelle des populations d'*A. bisporus* dans la nature.

Conclusion et Discussion générale

Conclusion-Discussion générale

Dans la première partie de ce travail (chapitre 1), neuf souches d'*A. bisporus* var. *bisporus*, représentatives de la diversité génétique de deux populations sauvages françaises, ont été sélectionnées, sur la base de critères phénotypiques et génotypiques. Un homocaryon de la variété *bisporus* à l'origine de souches de type « cultivars », une souche d'*A. bisporus* var. *eurotetrasporus* et une souche de l'espèce phylogénétiquement proche *Agaricus devoniensis* ont été ajoutées pour étudier la variabilité intraspécifique des génomes nucléaires et mitochondriaux (étude rapportée dans le chapitre 2, et publiée dans Jalalzadeh et al. 2014).

Chez *A. bisporus*, les séquences mitochondriales se caractérisent par des taux faibles de substitution nt, en comparaison avec ceux observés au niveau des séquences nucléaires. Ces faibles taux concernent tous les types de séquences : non seulement les séquences géniques mais aussi les séquences intergéniques et même les séquences considérées comme optionnelles telles des *heg* (homing endonuclease gene) introniques érodées ou encore des séquences provenant de l'insertion dans le mtADN de plasmides linéaires mitochondriaux de type « inverton-like ». Ces taux faibles de substitution nt s'accompagnent d'une importante mobilité (présence/absence) d'introns de groupe I, observée dans le gène mitochondrial *coxI* de cette espèce. L'hypothèse d'une corrélation entre taux de mutation et mobilité des introns a précédemment été émise par Lynch et al. (2006) à partir d'une analyse comparative, menée à un niveau interspécifique, sur des génomes mitochondriaux d'espèces couvrant plusieurs règnes eucaryotes (tels les plantes, les animaux ou les champignons).

Nos résultats sont en faveur d'une dynamique importante des introns de groupe I dans les gènes mitochondriaux d'*A. bisporus*, qui semblent pouvoir être aisément gagnés et perdus.

Les évènements de gain sont en accord avec la caractéristique précédemment rapportée chez *A. bisporus* (Ferandon et al. 2010 ; 2013), non seulement le gène *coxI* mais aussi la plupart

des gènes mitochondriaux constituent de grands réservoirs d'introns de groupe I. Chez les champignons, de telles « invasions » de séquences géniques par des introns ont été décrites chez de nombreuses espèces appartenant aux divisions Ascomycota et Basidiomycota (Torriani et al. 2014 ; Losada et al. 2014 ; Salavirta et al. 2014 comme exemples de publications récentes). Ainsi, Torriani et al. (2014) ont montré que, parmi quatre espèces du genre *Rhynchosporium*, trois possédaient des génomes mitochondriaux hébergeant des introns représentant de 8 à 40 % du génome. Cependant, au contraire d'*A. bisporus*, chez ces espèces, le taux de mutation du mtADN était 77 fois plus élevé que le nucléaire.

Comme décrit par Ferandon et al. (2010), une vue d'ensemble de la distribution des introns de groupe I dans les gènes *coxI* des eucaryotes est plutôt en faveur d'une évolution tournée vers la perte de ces éléments génétiques mobiles (base de la théorie « intron early »). Pour des raisons encore inconnues, *A. bisporus* et un petit nombre d'espèces se comportant comme des réservoirs d'introns s'opposent à cette règle générale.

Dans tous les cas, l'architecture des gènes *coxI* des différentes souches d'*A. bisporus* de notre étude, ne peut être expliquée par de simples événements de gains d'introns ou de *heg* mais nécessite aussi de faire intervenir des événements de perte comme chez la souche BS 243 (perte à la fois d'*iAbi10* et *iAbi11*). En effet, la présence ancestrale de ces deux introns repose sur les faits que (1) ces introns possèdent une large distribution dans les génomes mitochondriaux des eucaryotes, et (2), en particulier, ils sont retrouvés sur les génomes mitochondriaux des deux espèces *A. bisporus* et *A. devoniensis*.

Au contraire, *iabi9'* apparaît comme un intron « rare », rencontré à ce jour, spécifiquement chez certaines souches d'*A. bisporus*, et qui pourrait avoir été acquis (après transfert latéral) par certaines souches à partir d'un donneur inconnu.

Dans l'hypothèse du caractère ancestral de l'intron *iAbi10*, il est intéressant de noter que la proximité des sites d'insertion des introns *iAbi9'* et *iAbi10*, séparés par seulement 2 nt dans le

CDS du gène *cox1*, rend nécessaire la perte préalable de l'intron ancestral *iAbl10* pour acquérir l'intron *iAbl9'*. Ceci est en accord avec le mécanisme de transfert et d'intégration site-spécifique (= homing) décrit pour les introns de groupe I, qui nécessite la présence d'un site reconnu par la HE (Homing Endonuclease) codé par l'intron en cours d'acquisition, ici *iAbl9'*. Ce site n'existerait pas si *iAbl10* est présent dans le gène *cox1*. En effet, la protéine HE est une endonuclease codée par un intron et hautement spécifique de l'allèle dépourvu de cet intron. Cette enzyme se fixe à une longue séquence d'ADN (14 à 30 nt), appelée site de « homing » composée par les séquences exoniques flanquant le site où l'intron va être inséré. Une fois fixée sur le site, la HE réalise une coupure double-brin qui sera réparée par un système de réparation de l'ADN basé sur la recombinaison homologue. Ce système va ainsi permettre le transfert de la séquence intronique vers l'allèle clivé (Chevalier and Stoddard, 2001 ; Gimble, 2000). Donc, la présence d'*iAbl10* (en interrompant le site de homing reconnu par la HE d'*iAbl9'*) empêche la fixation de l'enzyme et, par conséquent, le transfert et l'intégration site spécifique de l'intron *iAbl9'* dans un gène contenant *iAbl10*.

Les *heg* hébergées par les introns de groupe I de notre étude peuvent être divisés en deux groupes : l'un constitué par des *heg* maintenus fonctionnels au cours de l'évolution (*iAbl9'*, *iAbl10*), l'autre composé d'*heg* érodés évoluant vers leur élimination (*iAbl14*). Nous avons vu que ces *heg* introniques codent pour des enzymes possédant une activité DNA endonucléase site-spécifique, impliquée dans la mobilité et le « homing » de l'intron (Pellenz et al. 2002). Une activité enzymatique additionnelle de type « maturase » a également été associée avec certaines HE codées par des introns de groupe I. Cette autre activité est impliquée dans l'épissage de l'intron au niveau ARN (Lazowska et al. 1980). Dans ce cas, une telle activité paraît nécessaire à la fonctionnalité de la mitochondrie car elle intervient dans l'épissage de l'intron et donc dans l'obtention d'un ARNm correct du gène *cox1* et donc de la protéine COX1, sous-unité indispensable du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. Par conséquent, nous

pouvons émettre l'hypothèse qu'une telle activité « maturase » prévient toute érosion de l'*heg* l'encodant. Au contraire, l'érosion d'un *heg* codant pour une protéine uniquement impliquée dans la mobilité de l'intron empêchera uniquement la dissémination de l'intron qui l'héberge et n'empêchera donc pas son érosion. Dans ce contexte, il est possible d'imaginer que l'intégration de l'ORF mobile envahissant l'*heg* de l'intron *iAbi11* pourrait conduire à une protéine chimérique conservant une activité d'épissage de l'intron mais qui pourrait être dépourvue de l'activité endonucléase nécessaire à la mobilité intronique. Il faut noter, que, en ce sens, l'*heg* d'*iAbi11* (interrompu ou non par l'ORF mobile) ne montre aucune trace d'érosion.

De façon intéressante, l'*heg* d'*iAbi14* et aussi le gène *rpo* d'origine plasmidique, tous deux portés par toutes les souches d'*A. bisporus* de notre étude et aussi par *A. devoniensis*, apparaissent à la fois comme des séquences fortement érodées mais cependant conservées dans leur état de vestige dans le mtADN des deux espèces, en relation avec le faible taux de substitution nt observé dans la mitochondrie d'*A. bisporus*. Ceci pourrait être expliqué par un changement dans la vitesse d'évolution du génome mitochondrial passant de rapide à lente. Chez les espèces d'*Agaricus* étudiées, le taux de mutation élevé expliquerait une importante érosion initiale des deux éléments génétiques mobiles (*heg* d'*iAbi14* et *rpo* plasmidique) sans effet sur la fonctionnalité et/ou le « fitness » mitochondrial. Puis, il y aurait eu, avant la spéciation entre *A. bisporus* et *A. devoniensis*, un évènement de perte d'un système mutagène de réparation du mtADN, faisant passer la vitesse d'évolution de ce génome de rapide à lente et expliquant le maintien des formes érodées dans le même état chez les deux espèces. Un tel évènement de perte d'un système de réparation mutagène a déjà été rapporté deux fois chez les plantes à fleurs (Palmer et al. 2000) et deux fois chez des organismes proches de la racine de l'arbre phylogénétique des animaux (Metazoa) comme les coraux (Hellberg, 2006).

De plus, nous avons vu précédemment que la mobilité des introns commence par la coupure site spécifique de l'ADN de la forme allélique receveuse au site d'insertion de l'intron,

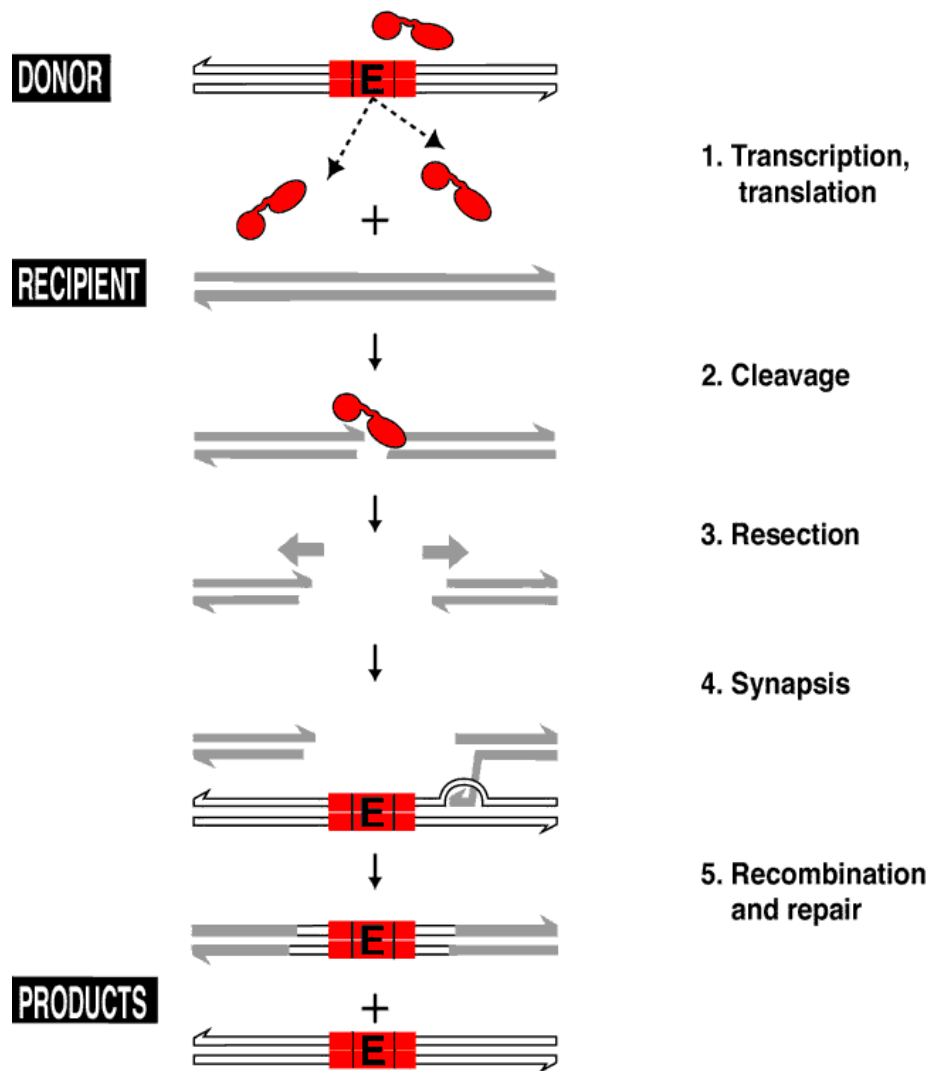


Figure D-1- Mécanisme de réparation basé sur la recombinaison homologue chez un intron de groupe I

suivie par une étape d'agrandissement du trou (résection) et un synapsis entre les allèles donneur et receveur de l'intron (Jurica and Stoddard, 1999 ; Stoddard, 2005). L'allèle intact est alors copié par un mécanisme de réparation basé sur la recombinaison homologue (Fig. D1). A partir de là, nous pourrions émettre l'hypothèse que, dans la mitochondrie ancestrale, deux systèmes de réparation auraient été présents : un système mutagène et un non mutagène basé sur la copie et la recombinaison d'un allèle intact. La perte du premier système (mutagène) aurait stimulé l'activité du second qui serait également impliqué dans le transfert et le homing des introns de groupe I, faisant du mtADN d'*A. bisporus* un grand réservoir d'introns de groupe I.

En résumé de cette partie de l'étude, nos travaux suggèrent que la mobilité et l'accumulation des éléments génétiques mobiles comme les introns de groupe I dans le génome mitochondrial d'*A. bisporus* pourraient être en relation avec le faible taux de substitution nt observé pour tous les types de séquences mitochondriales. Cette forte conservation des séquences mitochondriales d'*A. bisporus* contraste avec ce qui est classiquement admis pour l'évolution de ce type de séquences chez les champignons.

L'analyse des séquences nucléaires et mitochondriales établies ci-dessus a permis de définir (chapitre 3) des marqueurs moléculaires (de type CAPS et/ou RFLP) utilisables pour suivre le comportement de souches sauvages sélectionnées, lors de leur introduction dans un environnement naturel (parcelle expérimentale de cyprès) ou lors de simulations des conditions d'implantation réalisées dans une chambre de culture. De plus, les nombreux hétéromorphismes détectés dans les séquences nucléaires des souches sauvages hétérocaryotiques, ont permis de caractériser les formes alléliques portées par les six noyaux des trois souches principales de l'étude. Ces formes alléliques ont, en effet, été séparées après clonage moléculaire dans l'eubactérie *E. coli*. Elles permettront de mieux comprendre les mécanismes de reproduction de ce champignon à l'œuvre dans la structuration et l'évolution spatio-temporelle des populations dans leur milieu naturel.

L'analyse des populations sauvages d'*A. bisporus* est basée presque exclusivement sur l'analyse des génomes rencontrés dans les sporocarpes prélevés dans le milieu naturel. Ces sporocarpes sont formés de mycéliums hétérocaryotiques. Cependant, il est vraisemblable que des formes différentes de ces mycélia hétérocaryotiques soient également et simultanément présentes dans le milieu naturel: en particulier des spores homocaryotiques et/ou hétérocaryotiques, ou encore des mycélia homocaryotiques issus de la germination de ces spores. Ces formes sont difficiles à isoler et à caractériser, mais peuvent potentiellement jouer des rôles importants dans la structuration et l'évolution spatio-temporelle des populations sauvages. Nous avons donc choisi de réaliser, en conditions semi-contrôlées (« field-like conditions »), une simulation de la présence simultanée dans un substrat adapté à la croissance mycélienne (compost) d'un mycélium hétérocaryotique (forme supposée la plus répandue) et d'un nuage de spores provenant d'un sporocarpe placé à proximité. En effet, il est vraisemblable qu'au cours de l'établissement d'une population naturelle, la présence simultanée de mycélia hétérocaryotiques et de sporocarpes émettant des basidiospores en grand nombre est un évènement fréquent.

Nous avons donc décidé d'exposer à un nuage de basidiospores provenant de sporocarpes d'une souche sauvage, un mycelium hétérocaryotique provenant d'une autre souche sauvage d'*A. bisporus* var. *bisporus* et ayant préalablement envahi le substrat (bac de compost). L'expérience a été réalisée indépendamment avec la même souche donneuse de basidiospores mais deux souches réceptrices sauvages différentes.

Les sporophores différenciés ont été collectés durant un mois de fructification (1^{ère} volée). L'étude du génotype de ces sporocarpes a montré des résultats contrastés. Lors d'une des deux combinaisons de l'étude (Db243/Rm177), tous les sporophores analysés résultaient de la fructification du mycélium hétérocaryotique inoculé dans le compost et aucun rôle du nuage de spore n'a pu être montré. Au contraire, pour l'autre combinaison, impliquant le même nuage de spores mais un mycélium receveur hétérocaryotique différent (Db 243/Rm 256) la majorité des

sporocarpes analysés (80 %) provenaient de mycélia hybrides, issus d'un Phénomène de Buller entre le mycélium hétérocaryotique implanté et les basidiospores du nuage ou un mycélium provenant de la germination d'une de ces spores. Dans le détail, les mycelia hybrides possédaient, en quantité équivalente l'un ou l'autre des noyaux présents dans la souche donneuse des basidiospores mais tous le même noyau provenant du mycélium receveur. L'ensemble de ces résultats, en cours de rédaction pour publication, sont rassemblés dans le chapitre 4. Ils permettent d'envisager un rôle important du phénomène de Buller, impliquant basidiospores émises et mycélia hétérocaryotiques implantés, dans la diversité génétique des populations d'*A. bisporus* var. *bisporus*. Cependant, ils suggèrent aussi des possibilités d'existence de mécanismes, encore inconnus, permettant un contrôle de ce phénomène au niveau des mycelia hétérocaryotiques impliqués.

Une tentative de mise en évidence du rôle potentiel du phénomène de Buller comme moteur de diversité génétique des populations sauvages d'*A. bisporus* var. *bisporus* a été également initiée dans le dernier chapitre de cette thèse (chapitre 5) dans le cadre d'une étude plus large du comportement de souches sauvages après leur introduction dans deux parcelles expérimentales constituant un biotope naturel pour cette espèce: la litière de cyprès.

En effet, des souches sauvages françaises sélectionnées dans les chapitres précédents et, en particulier les souches Db et Rm du chapitre 4 (Bs177, Bs243 et Bs 256), ont été introduites, soit de manière isolée soit en couple, au pied de cyprès. En plus de ces trois souches, une autre souche d'*A. bisporus* var. *bisporus* a été introduite pour servir de « marqueur » spécifique à chacune des parcelles (Bs240 dans la parcelle I, Bs254 dans la parcelle II). De même, une souche française d'*A. bisporus* var. *eurotetrasporus* et d'*A. subrufescens* ont été introduites dans chaque parcelle, afin de suivre leur comportement.

Une vérification préalable des mycelia présents dans ces litières n'a montré aucune trace d'une espèce appartenant au genre *Agaricus*. Cependant, les résultats de ces analyses sommaires

ne permettent pas de conclure à l'absence de souches autochtones appartenant à l'espèce *A. bisporus* dans les parcelles expérimentales.

Le protocole d'introduction des souches (à partir de compost envahi par du mycélium hétérocaryotique) prévoyait l'induction « précoce » d'initiations fructifères obtenues par l'addition, sur les inocula, d'une terre de gobetage. La grande majorité des inocula ont ainsi conduit à l'apparition de sporocarpes, en quantité cependant plus faible que lors de cultures sur compost. Ceci suggère que, dans le milieu naturel, de nombreux facteurs environnementaux non maîtrisés réguleraient l'apparition des sporocarpes. Ceci est en accord avec les observations des populations naturelles qui montrent que, comme l'a décrit Kerrigan et al. (1993a), dans les biotopes où *A. bisporus* est naturellement présent, les sporocarpes apparaissent de façon imprévisible et, dans la majorité des cas, en beaucoup plus petit nombre que lors des cultures de type industriel où les rendements (en nombre de sporocarpes différenciés au cours de la 1^{ère} volée) sont très élevés et hautement prévisibles. De même, sur les parcelles, aucun sporocarpe de l'espèce introduite *A. subrufescens* n'a été obtenu, bien que cette espèce thermophile ait déjà été décrite dans la litière de cyprès.

Comme attendu, les sporocarpes récoltés aux différents lieux d'introduction (1^{ère} ou 2^{ème} volées) avaient tous le génotype de la souche introduite, confirmant qu'ils résultaient de simples évènements de fructification des mycélia hétérocaryotiques introduits.

Depuis les deux premières volées, observées dans les six mois suivant l'introduction des souches, aucun sporocarpe n'a été observé sur les deux parcelles expérimentales. Ceci pose le problème de la compréhension des mécanismes impliqués dans la différenciation des organes fructifères en milieu naturel. Cet événement semblant, au contraire de ce qui est observé lors de cultures en chambre où en conditions industrielles, beaucoup plus rare et imprévisible. Une recherche préliminaire, par une approche de culture (approche microbiologique) ou une approche

moléculaire n'a pas permis de vérifier le maintien de mycélia d'*A. bisporus* aux lieux d'introduction (résultats non montrés dans cette thèse).

Ceci conduit à envisager deux hypothèses :

- soit (1) le protocole d'introduction des souches sauvages n'a pas permis d'assurer la survie sur le long terme (2 ans après leur introduction) de ces souches qui auraient donc été éliminées du milieu naturel suite à une pression environnementale pouvant présenter des causes variées (conditions climatiques, compétition avec d'autres organismes fongiques ou autres comme des bactéries, prédation par des nématodes);

- soit (2), les souches introduites sont encore présentes dans la parcelle et les manifestations de leur présence (sous la forme d'organes fructifères aisément détectables) ne se produiront que de façon rare et sporadique. Cette deuxième hypothèse nécessite la surveillance sur le long terme de la parcelle et, en parallèle, le développement d'outils performants de détection des souches introduites dans la litière de cyprès.

Ces éléments devraient permettre d'utiliser les outils et dispositifs mis en place au cours de cette thèse pour comprendre l'évolution spatio-temporelle des populations d'*A. bisporus* dans la nature.

Références bibliographiques

- Allen J, Moore D, Elliott TJ (1990) Are the two spored basidia of *Agaricus bisporus* the products of mitotic divisions? Fourth International Mycological Congress, Regensburg, F.R.G
- Allen J, Moore D, Elliott TJ (1992) Persistent meiotic arrest in basidia of *Agaricus bisporus*. Mycol. Res 96: 125-127
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215(3):403–410
- Ariola PE, Ellstrand NC (1996) Crop- to- weed gene flow in the genus *Sorghum* (Peaceae): spontaneous inter specific hybridization between johnsongrass, *Sorghum halepense*, and crop sorghum, *S. bicolor*. Am J Bot: 1153-1160
- Awise JC (1994) Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, New York.
- Barroso G, Blesa S, Labarère J (1995) Wide distribution of mitochondrial genome rearrangements in wild strains of the basidiomycete *Agrocybe aegerita*. Appl Environ Microbiol 61: 1187-1193
- Barroso G, Sirand-Pugnet P, Mouhamadou B, Labarère J (2003) Secondary structure and molecular evolution of the mitochondrial small subunit ribosomal RNA in Agaricales (Euagarics clade, Homobasidiomycota). J. Mol. Evol 57: 383–396
- Basse CW (2010) Mitochondrial inheritance in fungi. Curr Opin Microbiol 13: 712–719
- Birky Jr, CW (2001) The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. Annu. Rev. Genet. 35, 125–148
- Bois F, Barroso G, Gonzalez P, Labarère J (1999) Molecular cloning, sequence and expression of Aa-polB, a mitochondrial gene encoding a family B DNA polymerase from the edible basidiomycete *Agrocybe aegerita*. Mol. Gen. Genet 261: 508–513
- Bruggeman J, Debets AJM., Wijngaarden PJ, deVisser JGM, Hoekstra RF (2003) Sex Slows Down the Accumulation of Deleterious Mutations in the Homothallic Fungus *Aspergillus nidulans* Genetics 164: 479–485
- Buller, AHR (1931) Researches on fungi, vol. IV. Longmans, Green and Co., London, United Kingdom
- Bullock WO, Fernandez JM, Stuart JM (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. Bio Techniques 5: 376-379
- Bunyard BA, Nicholsonb MS, Royse DJ (1996) Phylogeny of the Genus *Agaricus* Inferred from Restriction Analysis of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA. Fungal Genet Biol 20 (4): 243–253
- Callac P, Billette C, Imbernon M, Kerrigan RW (1993) Morphological, genetic, and interfertility analyses reveal a novel, tetrasporic variety of *Agaricus bisporus* from the Sonoran desert of California. Mycologia 85: 835–851

- Callac P (1994) Looking for *Agaricus bisporus* in France: historical and scientific background, first results. Bulletin trimestriel de la Société mycologique de France 110(3):145-165
- Callac P (1995) Breeding of edible fungi with emphasis on the variability among French genetic resources of *Agaricus bisporus*. Can J Bot 73: 980-986
- Callac P, Imbernon M, Kerrigan RW, Olivier JM (1996) The two life cycles of *Agaricus bisporus*. Mushroom biology and mushroom product. Proceedings of the Second International Conference. Royse (ed) Penn State Univ. 57-66
- Callac P, Desmerger C, Kerrigan RW, Imbernon M (1997) Conservation of genetic linkage with map expansion in distantly related crosses of *Agaricus bisporus*. FEMS Microbiol. Lett. 146: 235–240
- Callac P, Moquet F, Imbernon M, Guedes-Lafargue MR, Mamoun M, Olivier JM (1998) Evidence for PPC1, a determinant of the pilei-pellis color of *Agaricus bisporus* fruitbodies. Fungal Genet. Biol 23: 181–188
- Callac P, Jacobe de Haut IJ, Imbernon M, Guinberteau J, Desmerger C, Theochari L (2003) A novel homothallic variety of *Agaricus bisporus* comprises rare tetrasporic isolates from Europe. Mycologia 95: 222–231
- Callac P, Spataro C, Caille A, Imbernon M (2006) Evidence for Outcrossing via the Buller Phenomenon in a Substrate Simultaneously Inoculated with Spores and Mycelium of *Agaricus bisporus*. Appl Environ Microbiol 72 (4): 2366–2372
- Chang ST (2005) Witnessing the development of the mushroom industry in China. Proceeding of ICMBMP5 12:3-19
- Chevalier BS, Stoddard BL (2001) Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. Nucleic Acids Res 29(18):3757-74
- De la Bastide PY, Sonnenberg ASM, Van Griensven LJLD, Anderson J.B., Horgen, P.A., 1997. Mitochondrial haplotype influences mycelial growth of *Agaricus bisporus* heterokaryons. Appl. Environ. Microbiol. 63 (9), 3426–3431
- De la Bastide PY, Horgen PA (2003) Mitochondrial inheritance and the detection of non-parental mitochondrial DNA haplotypes in crosses of *Agaricus bisporus* homokaryons. Fungal Genetics and Biology 38: 333–342
- Duncan EJ, Galbraith MN (1972) Postmeiotic events in the Homobasidiomycetes. Trans Br Mycol Soc 58(3):387–392
- Elliott TJ (1972) Sex and the single spore. Mushroom Sci.VIII:11-18
- Evans HJ. 1959. Nuclear behaviour in the cultivated mushroom. Chromosoma 10:115–135.
- Ferandon C, Moukha S, Callac P, Benedetto JP, Castroviejo M, Barroso G (2010) The *Agaricus bisporus* *cox1* gene: the longest mitochondrial gene and the largest reservoir of mitochondrial group I introns. PLoS One 5 (11): e14048

Ferandon C, Xu JP, Barroso G (2013) The 135 kbp mitochondrial genome of *Agaricus bisporus* is the largest known eukaryotic reservoir of group I introns and plasmid-related sequences. *Fungal Genet Biol* 55:85–91

Formighieri EF, Tiburcio RA, Armas ED et al. (2008). The mitochondrial genome of the phytopathogenic basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* is 109 kb in size and contains a stable integrated plasmid. *Mycol. Res* 112: 1136–1152.

Foulongne-Oriol M, Spataro C, Savoie JM (2009) Microsatellite markers isolated in the white button mushroom *Agaricus bisporus* are suitable for genetic studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 84: 1125–1135

Foulongne-Oriol M, Spataro C, Cathalot V, Monllor S, Savoie JM (2010) An expanded genetic linkage map of an intervarietal *Agaricus bisporus* var. *bisporus* × *A. bisporus* var. *burnettii* hybrid based on AFLP, SSR and CAPS markers sheds light on the recombination behaviour of the species. *Fungal Genet. Biol* 47: 226–236

Gimble FS (2000) Invasion of a multitude of genetic niches by mobile endonuclease genes. *FEMS Microbiol Lett* 185(2):99-107

Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science: Research Library Core*, page 1476.

Grogan HM, Adie AT, Gaze RH, Challen MP, Mills PR (2003) Double-stranded RNA elements associated with the MVX disease of *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res* 107: 147–154

Hanahan D (1983) Studies on the transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol* 166 (4): 557–580

Hellberg ME (2006) No variation and low synonymous substitution rates in coral mtDNA despite high nuclear variation. *BMC Evol Biol* 6:24.

Hintz WEA, Anderson JB, Horgen PA (1988) Nuclear migration and mitochondrial inheritance in the mushroom *Agaricus bitorquis*. *Genetics* 119:35-41

Horgen PA, Carvalho D, Sonnenberg A, Li A, Van Griensven LJLD (1996) Chromosomal abnormalities associated with strain degeneration in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Fungal Genet Biol* 20:229–241.

Imbach EJ. (1946) "Pilzflora des Kantons Luzern und der angrenzen Innerschweiz". *Mitteilungen der naturforschenden Gesellschaft Luzern* (in German) 15: 5–85

Imbernon M, Callac P, Granit S, Pirobe L (1995) Allelic polymorphism at the mating type locus in *Agaricus bisporus* var. *burnettii*, and confirmation of the dominance of its tetrasporic trait. *Mushroom Sci.* 14:11–19.

Imbernon M, Callac P, Gasqui P, Kerrigan RW, Velcko Jr AJ (1996) BSN, the primary determinant of basidial spore number and reproductive mode in *Agaricus bisporus*, maps to chromosome 1 *Mycologia* 88: 749–761.

- Isaacs BF (1967) Studies in the genus *Agaricus*- I. *Agaricus cretacellus* and its relationships. Mich. Bot 6: 3-12.
- Jalalzadeh B, Sare Carras I, Ferandon C, Callac P, Farsi M, Savoie JM, Barroso G (2014) The intraspecific variability of mitochondrial genes of *Agaricus bisporus* reveals an extensive group I intron mobility combined with low nucleotide substitution rates. Curr. Genet
- Jin T, Sonnenberg ASM, Van Griensven LJLD, Horgen PA (1992) Investigation of mitochondrial transmission in selected matings between homokaryons from commercial and wild-collected isolates of *Agaricus bisporus* (= *Agaricus brunnescens*). Appl. Environ. Microbiol. 58, 3553–3560.
- Jin T, Horgen PA (1993) Further characterization of a large inverted repeat in the mitochondrial genomes of *Agaricus bisporus* (= *Agaricus brunnescens*) and related species. Curr. Genet. 23: 228–233
- Jin T, Horgen PA (1994) Uniparental mitochondrial transmission in the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. Appl. Environ. Microbiol 60: 4456–4460
- Jurica MS, Stoddard BL (1999) Homing endonucleases: structure, function and evolution. Cell Mol Life Sci 55(10):1304-26
- Kamada T, Tanabe S (1995) The role of the cytoskeleton in the movement and positioning of nuclei in *Coprinus cinereus*. Can J Bot 73(I):S364–S368.
- Kamzolkina OV , Volkova VN, Kozlova MV, Elena V, Pancheva Y, Dyakov T, Callac P (2006) Karyological evidence for meiosis in the three different types of life cycles existing in *Agaricus bisporus*. Mycologia 98(5):763–770
- Kerrigan RW (1987) What's in a name? the chae- taceous case of the chaste champignon. In: Cultivatingediblefungi. Eds., P. J. Wuest, D. J. Royse, and R. B. Beelman. Elsevier, Amsterdam
- Kerrigan RW, Ross IK (1987) Dynamic aspects of basidiospore number in *Agaricus*. Mycologia 79:204–215
- Kerrigan RW, Ross IK (1989) Allozymes of a wild *Agaricus bisporus* population: New alleles, new genotypes. Mycologia 81: 433-443
- Kerrigan RW (1990) Evidence of genetic divergence in two populations of *Agaricus bisporus*. Mycol. Res 94:721–733
- Kerrigan RW, Horgen PA, Anderson JB (1993a) the California Population of *Agaricus bisporus* Comprises at Least Two Ancestral Elements. Systematic Botany 18(1): 123-136
- Kerrigan RW, Royer JC, Baller LM, Kohli Y, Horgen PA, Anderson JB (1993b) Meiotic behavior and linkage relationships in the secondarily homothallic fungus *Agaricus bisporus*. Genetics 33:225–236
- Kerrigan RW, Imbernon M, Callac P, Billette C, Olivier JM (1994) The heterothallic life cycle of *Agaricus bisporus* var. *burnettii* and the inheritance of its tetrasporic trait. Exp. Mycol 18: 193–210

- Kerrigan RW, Carvalho DB, Horgen PA, Anderson JB (1995a) Indigenous and introduced populations of *Agaricus bisporus*, the cultivated button mushroom, in eastern and western Canada: implications for population biology, resource management, and conservation of genetic diversity. *Can. J. Bot* 73: 1925–1938
- Kerrigan RW (1995b) Global genetic resources for *Agaricus* breeding and cultivation. *Can. J. Bot* 73: S973–S979
- Kerrigan R.W, Carvalho DB, Horgen PA, Anderson JB (1998) The indigenous coastal California population of the mushroom *Agaricus bisporus*, a cultivated species, may be at risk of extinction. *Mol. Ecol.* 7: 35–45
- Khush, RS, Watch MP, Horgen PA (1995) Molecular Strategy for *Agaricus* Breeding. In: *The Mycota, Vol. II. Genetics and Biotechnology*, Kuck, U. (Ed.). Springer- Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, ISBN: 3540427708, pp: 321-337
- Kothe E (2001) Mating-type genes for basidiomycete strain improvement in mushroom farming. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:602–612
- Kuhner R (1977) Variation of nuclear behavior in the homobasidiomycetes. *Trans. Br. Mycol. Soc* 68:1–16
- Lange JE (1926) Studies in the agarics of Denmark. Part VI. Psalliota, Russula. *Dansk botanisk Arkiv* 4 (12): 1–52
- Langton FA, Elliott TJ (1980) Genetics of secondarily homothallic basidiomycetes. *Heredity* 45: 99-106
- Lazowska J, Jacq C, Slonimski PP (1980) Sequence of introns and flanking exons in wild-type and box3 mutants of cytochrome b reveals an interlaced splicing protein coded by an intron. *Cell* 22(2 Pt 2):333-48
- Liu K, Muse SV (2005) PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21(10): 2128-2129.
- Losada L, Barker BM, Pakala S, Pakala S, Joardar V, Zafar N, Mounaud S, Fedorova N, Nierman WC, Cramer RA (2014) Large-Scale transcriptional response to hypoxia in *Aspergillus fumigatus* observed using RNAseq identifies a novel Hypoxia regulated ncRNA. *Mycopathologia* [Epub ahead of print]
- Lynch M (2006) The origins of eukaryotic gene structure. *Mol Biol Evol* 23:450–468
- Malloch D, Castle A, Hintz W (1987) Further Evidence for *Agaricus runnescens* Peck as the Preferred Name for the Cultivated *Agaricus*. *Mycologia* 79 (6): 839-846
- Miller, R. E. 1971. Evidence of sexuality in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 63:630-634
- Miller RE, Kananen D L (1972) Bipolar sexuality in the mushroom. *Mushroom Sci* 8:713–718.

- Morin E, Kohlera A, Baker AR et al (2012) The genome sequence of the button Mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanism governing adaptation to a humic -rich ecological niche. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:17501–17506
- Moquet F, Desmerger C, Mamoun M, Ramos-Guedes-Lafargue M, Olivier JM (1999) A quantitative trait locus of *Agaricus bisporus* resistance to *Pseudomonas tolaasii* is closely linked to natural cap color. *Fungal Genet. Biol* 28: 34–42
- Noël T, Labarère J (1987) Isolation of DNA from *Agrocybe aegerita* for the construction of a genomic library in *Escherichia coli*. *Mushroom Sci.* 12:187–201
- Palmer JD, Adams KL, Cho Y, Parkinson CL, Qiu YL Song K (2000). Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: Mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 6960–6966
- Peck CH (1900) New species of fungi. *Bull. Torrey Bot. Club* 27: 14-21
- Pellenz S, Harington A, Dujon B, Wolf K, Schäfer B (2002) Characterization of the I-Spom I endonuclease from fission yeast: insights into the evolution of a group I intron-encoded homing endonuclease. *J Mol Evol* 55(3):302-13
- Raper CA, Raper JR, Miller RE (1972) Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 64:1088–1117
- Raper CA, Kaye C (1978) Sexual and other relationships in the genus *Agaricus*. *J. Gen. Microbiol* 105:135-151
- Raper JR (1966) *Genetics of Sexuality in Higher Fungi*. Ronald Press: New York
- Robison MM, Horgen PA (1996) Plasmid RNA polymerase-like mitochondrial sequences in *Agaricus bitorquis*. *Curr. Genet* 29: 370–376
- Ross IK, Margalith P (1987) Nuclear behavior in the basidia of the secondarily homothallic *Coprinus bilanatus*. *Mycologia* 79:595–602
- Royse DJ, May B (1982) Use of isozyme variation to identify genotypic classes of *Agaricus brunnescens*. *Mycologia* 74: 93-102
- Saksena KN, Marino R, Haller MN, Lemke PA (1976) Study on development of *Agaricus bisporus* by fluorescent microscopy and scanning electron microcopy. *J Bact* 126:417–428
- Salavirta H, Oksanen I, Kuuskeri J, Mäkelä M, Laine P, Paulin L, Lundell T (2014) Mitochondrial genome of *Phlebia radiata* is the second largest (156 kbp) among fungi and features signs of genome flexibility and recent recombination events. *PLoS One* 9(5):e97141
- Savoie JM, Foulongne-Oriol M, Barroso G, Callac P (2013) Genetics and genomics of cultivated mushrooms, application to breeding of Agarics *The Mycota XI F. Kempken (Ed.)* © Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 33p.

- Singer R (1984) *Agaricus brunnescens* Peck and *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. Mycotaxon 20: 479- 482
- Sinden JW, Schisler LC (1962) Nutrient supplementation of mushroom compost at casing. Mush Sci 5: 267–280
- Smith M L, Bruhn JN, Anderson JB (1992) The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. Nature 356: 428 - 431
- Sonnenberg ASM, Baars JJP, Mikosch TSP, Schaap PJ, Van Griensven LJLD (1999) A transposon-like element in the genome of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. Appl Environ Microbiol 65(8):3347–3353
- Sonnenberg ASM, Baars JJP, Hendrickx PkM, Lavrijssen B, Gao W, Weijn A, Mes JJ (2011) Breeding and Strain Protection in the button mushroom *Agaricus bisporus*. Proceeding of ICMBMP7, 1:7-15
- Spear MC, Royse DJ, May B (1983) Atypical meiosis and joint segregation of biochemical loci in *Agaricus brunnescens*. J. Hered 74: 417-420
- Stepanova AA, Vasilyev AE (1994) Ultrastructural bases of mushroom morphogenesis. Ashgabat: Ylym Publishing House. 264 p.
- Stoddard BL (2005) Homing endonuclease structure and function. Q Rev Biophys 38(1):49-95
- Summerbell RC, Castle ZJ, Horgen PA, Anderson JB (1989) Inheritance of restriction fragment length polymorphisms in *Agaricus brunnescens*. Genetics 123:293–300
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22:4673–4680
- Torriani SF, Penselin D, Knogge W, Felder M, Taudien S, Platzer M, McDonald BA, Brunner PC (2014) Comparative analysis of mitochondrial genomes from closely related *Rhynchosporium* species reveals extensive intron invasion. Fungal Genet Biol 62:34-42
- Wang ZS, Liao JH, Li FG, Wang HC (1991) Studies on genetic basis of esterase isozyme loci Est A, B, and C in *Agaricus bisporus*. Mushroom Sci 13: 3-9
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic press, San Diego, p 315–322
- White MJD (1973) Animal Cytology and Evolution. Cambridge University Press, London
- Whitehouse HLK (1949) Heterothallism and sex in the fungi. Biological Reviews 24:(4) 411-447
- Woolston BM, Schlaghauser C, Wilkinson J, Larsen J, Shi Z, Mayer KM, Walters DS, Curtis WR, Romain CP Long-Distance Translocation of Protein during Morphogenesis of the Fruiting Body in the Filamentous Fungus, *Agaricus bisporus*. PloS One 6 (12) e28412.

- Xu J, Kerrigan RW, Horgen PA, Anderson JB (1993a) Localization of the mating-type gene in *Agaricus bisporus*. *Appl Env Microbiol* 59:3044–3049
- Xu J, Horgen PA, Anderson JB (1993b) Media and temperature effects on mating interactions of *Agaricus bisporus*. *Cultivated Mushroom Res. Newslett* 1: 25–32
- Xu J, Horgen PA, Anderson JB (1996) Somatic recombination in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* *Mycol. Res* 100 (2): 188-192
- Xu J, Kerrigan RW, Callac P, Horgen PA, Anderson JB (1997) Genetic structure of natural populations of *Agaricus bisporus*, the commercial button mushroom. *J. Hered* 88: 482-488
- Xu J, Kerrigan RW, Sonnenberg, AS, Callac P, Horgen PA, Anderson JB (1998) Mitochondrial DNA variation in natural populations of the mushroom *Agaricus bisporus*. *Mol. Ecol* 7: 19–33
- Xu J, Desmerger C, Callac P (2002) Fine-scale genetic analyses reveal unexpected spatial-temporal heterogeneity in two natural populations of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology* 148:1253–1262
- Xu J (2005) The inheritance of organelle genes and genomes: patterns and mechanisms. *Genome* 48: 951–958
- Xu J, Zhang Y, Pun N (2013) Mitochondrial recombination in natural populations of the button mushroom *Agaricus bisporus*. *Fungal Genet Biol* 55: 92–97

Annexes

a.
>its1
TGTTTTCTAGCTGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGTATGTGCACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTT
TGTAAGTCTTTTTTCAGGTATTGGAGGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTTTTCTGGTGGATGTAAGGACTTGCAGTGTGAAAACAGTG
CTGTCCTTTACCTTGCCCATGGAATCTTTTCTGTTAGAGTCTATGTTATTCATTATACTCTTAGAATGTCATTGAATGTCT
TTACATGGGCTATGCCTATGAAAATTATTATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGG
AGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATTATATTCTCAACTCTCCAATACTTTTGTGTAAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGTTTGCTG
GCCTCTTAATTGGGGTCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACTCGTCTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAACTTATCTACAC
TGGCGAGGGGATTGCTTTCTGATGTTTCTAGCTTCTAATCGTCTAAGGACAATTTCTTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGA
CTACCCGCTGAACTTAA

b.
>its2
TGTTTTCTAGCTGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGTATGTGCACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTT
TGTAAGTCTTTTTTCAGGTATTGGAGGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTTTTCTGGTGGATGTAAGGACTTGCAGTGTGAAAACAGTG
CTGTCCTTTACCTTGCCCATGGAATCTTTTCTGTTAGAGTCTATGTTATTCATTATACTCTTAGAATGTCATTGAATGTCT
TTACATGGGCTATGCCTATGAAAATTATTATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGG
AGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATTATATTCTCAACTCTCCAATACTTTTGTGTAAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGTTTGCTG
GCCTCTTAATTGGGGTCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACTCGTCTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAACTTATCTACAC
TGGCGAGGGGATTGCTTTCTGATGTTTCTAGCTTCTAATCGTCTAAGGACAATTTCTTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGA
CTACCCGCTGAACTTAA

c.
>its3
TGTTTTCTAGCTGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGTATGTGCACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTT
TGTAAGTCTTTTTTCAGGTATTGGAGGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTTTTCTGGTGGATGTAAGGACTTGCAGTGTGAAAACAGTG
CTGTCCTTTACCTTGCCCATGGAATCTTTTCTGTTAGAGTCTATGTTATTCATTATACTCTTAGAATGTCATTGAATGTCT
TTACATGGGCTATGCCTATGAAAATTATTATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGG
AGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATTATATTCTCAACTCTCCAATACTTTTGTGTAAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGTTTGCTG
GCCTCTTAATTGGGGTCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACTCGTCTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAACTTATCTACAC
TGGCGAGGGGATTGCTTTCTGATGTTTCTAGCTTCTAATCGTCTAAGGACAATTTCTTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGA
CTACCCGCTGAACTTAA

d.
>its4
TGTTTTCTAGCTGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGTATGTGCACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTT
TGTAAGTCTTTTTTCAGGTATTGGAGGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTTTTCTGGTGGATGTAAGGACTTGCAGTGTGAAAACAGTG
CTGTCCTTTACCTTGCCCATGGAATCTTTTCTGTTAGAGTCTATGTTATTCATTATACTCTTAGAATGTCATTGAATGTCT
TTACATGGGCTATGCCTATGAAAATTATTATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGG
AGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATTATATTCTCAACTCTCCAATACTTTTGTGTAAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGTTTGCTG
GCCTCTTAATTGGGGTCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACTCGTCTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAACTTATCTACAC
TGGCGAGGGGATTGCTTTCTGATGTTTCTAGCTTCTAATCGTCTAAGGACAATTTCTTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGA
CTACCCGCTGAACTTAA

e.
>its5
TGTTTTCTAGCTGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGTATGTGCACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTT
TGTAAGTCTTTTTTCAGGTATTGGAGGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTTTTCTGGTGGATGTAAGGACTTGCAGTGTGAAAACAGTG
CTGTCCTTTACCTTGCCCATGGAATCTTTTCTGTTAGAGTCTATGTTATTCATTATACTCTTAGAATGTCATTGAATGTCT
TTACATGGGCTATGCCTATGAAAATTATTATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCCTCCTTGGTATTCCGAGG
AGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATTATATTCTCAACTCTCCAATACTTTTGTGTAAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGTTTGCTG
GCCTCTTAATTGGGGTCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACTCGTCTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAACTTATCTACAC
TGGCGAGGGGATTGCTTTCTGATGTTTCTAGCTTCTAATCGTCTAAGGACAATTTCTTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGA
CTACCCGCTGAACTTAA

Figure S1– Séquences des cinq allèles ITS portés par les six noyaux des trois souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* Bs177 (*its1/its2*), Bs243 (*its3/its4*) et Bs256 (*its5/its5*). Les SNP polymorphes permettant la discrimination des différentes formes alléliques sont encadrés en couleur.

a.

>frk1

```
ATGGGAAACGTGGAATGTCTGGTTTCGACCAAAGTTTCGACGACGGACTGCCGTGATAGGTTCACTGACGTCACTATTATTAGCAC
GATCCGGAGCTCCGCGGTGAGAAATTCCAAACCTTTCCCAATTCCAATGCTACCTCGTATCATACTCGAAAATCTGCAAAGGA
TCATCCGATGCTCAGTTCACCGGACATCTTCCCAAGGCTCAGTCATCACTGGTCAAACGTATTTCTGTGAAATCAGGATCG
CCGTCCGAGTCTGAGCAGTATCTTGGCGAAGCGCGATCACTCGAAGCCATAGGTACCGCAGCTCCTGGGCTTGCGCCAGCGAT
GATTGCCTACGGTAACGGTGAAGATGGGAGCCTTTCTTTGTTTCGGAATACAAGGACATGGCGCCTCTGTCTTCGGGTGCCT
CCGATCTTCTAGCGAAGAGGCTGGCAACTGAGTTACATCAGTACAAGAGCCACGAGGGCTTTGGGTTTGAGGTTCCGACTTTT
TGTGGAGCAACGCGTCAGAGGAATGGCTGGTATACAACCTTGGGAGCAATGCTACAGTAATTTGATAGGAATCTGCTAGATGG
TCTGTCTCGACGAGAGCATAGCGCTCTCTGACGAAGGGAGAAAAGATACGAGAAAGTACGTGCCTTTGACCGAGCGAATTG
AGATGGCAGCTAATTAGTTAAAATGAACGCAAATCAGGGTGATTCCAGGTTGCTTGGTACGAGAGTACAGTCTCGGTTATG
TCCTTTCTTGA
```

b.

>frk2

```
ATGGGAAACGTGGAATGTCTGGTTTCGACCAAAGTTTCGACGACGGACTGCCGTGATAGGTTCACTGACGTCACTATTATTAGCAC
GATCCGGAGCTCCGCGGTGAGAAATTCCAAACCTTTCCCAATTCCAATGCTACCTCGTATCATACTCGAAAATCTGCAAAGGA
TCATCCGATGCTCAGTTCACCGGAAATCTTCCCAAGGTTTCACTGGTCAAACGTATTTCTGTGAAATCAGGATCG
CCGTCCGAGTCTGAGCAGTATCTTGGCGAAGCGCGATCACTCGAAGCCATAGGTACCGCAGCTCCTGGGCTTGCGCCAGCGAT
GATTGCCTACGGTAACGGTGAAGATGGGAGCCTTTCTTTGTTTCGGAATACAAGGATATGGCGCCTCTGTCTTCGGGTGCCT
CTGATCTTCTAGCGAAGAGGCTGGCAACTGAGTTACATCAGTACAAGAGCCACGAGGGCTTTGGGTTTGAGGTTCCGACTTTT
TGTGGAGCAACGCGTCAGAGGAATGGCTGGTATACAACCTTGGGAGCAATGCTACAGTAATTTGATAGGGAATCTGCTAGATGG
TCTGTCTCGACGAGAGCATAGCGCTCTCTGACGAAGGGAGAAAAGATACGAGAAAGTACGTGCCTTTGACCGAGCGAATTG
AGATGGCAGCTAATTAGTTAAAATGAACGCAAATCAGGGTGATTCCAGATTGCTTGGTACGAGAGTACAGTCTCGGTTATG
TCCTTTCTTGA
```

c.

>frk3

```
ATGGGAAACGTGGAATGTCTGGTTTCGACCAAAGTTTCGACGACGGACTGCCGTGATAGGTTCACTGACGTCACTATTATTAGCAC
GATCCGGAGCTCCGCGGTGAGAAATTCCAAACCTTTCCCAATTCCAATGCTACCTCGTATCATACTCGAAAATCTGCAAAGGA
TCATCCGATGCTCAGTTCACCGGAAATCTTCCCAAGGTTTCACTGGTCAAACGTATTTCTGTGAAATCAGGATCG
CCGTCCGAGTCTGAGCAGTATCTTGGCGAAGCGCGATCACTCGAAGCCATAGGTACCGCAGCTCCTGGGCTTGCGCCAGCGAT
GATTGCCTACGGTAACGGTGAAGATGGGAGCCTTTCTTTGTTTCGGAATACAAGGATATGGCGCCTCTGTCTTCGGGTGCCT
CTGATCTTCTAGCGAAGAGGCTGGCAACTGAGTTACATCAGTACAAGAGCCACGAGGGCTTTGGGTTTGAGGTTCCGACTTTT
TGTGGAGCAACGCGTCAGAGGAATGGCTGGTATACAACCTTGGGAGCAATGCTACAGTAATTTGATAGGGAATCTGCTAGATGG
CCTGTCTCGACGAGAGCATAGCGCTCTCTGACGAAGGGAGAAAAGATACGAGAAAGTACGTGCCTTTGACCGAGCGAATTG
AGATGGCAGCTAATTAGTTAAAATGAACGCAAATCAGGGTGATTCCAGATTGCTTGGTACGAGAGTACAGTCTCGGTTATG
TCCTTTCTTGA
```

d.

>frk4

```
ATGGGAAACGTGGAATGTCTGGTTTCGACCAAAGTTTCGACGACGGACTGCCGTGATAGGTTCACTGACGTCACTATTATTAGCAC
GATCCGGAGCTCCGCGGTGAGAAATTCCAAACCTTTCCCAATTCCAATGCTACCTCGTATCATACTCGAAAATCTGCAAAGGA
TCATCCGATGCTCAGTTCACCGGAAATCTTCCCAAGGTTTCACTGGTCAAACGTATTTCTGTGAAATCAGGATCG
CCGTCCGAGTCTGAGCAGTATCTTGGCGAAGCGCGATCACTCGAAGCCATAGGTACCGCAGCTCCTGGGCTTGCGCCAGCGAT
GATTGCCTACGGTAACGGTGAAGATGGGAGCCTTTCTTTGTTTCGGAATACAAGGATATGGCGCCTCTGTCTTCGGGTGCCT
CTGATCTTCTAGCGAAGAGGCTGGCAACTGAGTTACATCAGTACAAGAGCCACGAGGGCTTTGGGTTTGAGGTTCCGACTTTT
TGTGGAGCAACGCGTCAGAGGAATGGCTGGTATACAACCTTGGGAGCAATGCTACAGTAATTTGATAGGGAATCTGCTAGATGG
CCTGTCTCGACGAGAGCATAGCGCTCTCTGACGAAGGGAGAAAAGATACGAGAAAGTACGTGCCTTTGACCGAGCGAATTG
AGATGGCAGCTAATTAGTTAAAATGAACGCAAATCAGGGTGATTCCAGATTGCTTGGTACGAGAGTACAGTCTCGATTATG
TCCTTTCTTGA
```

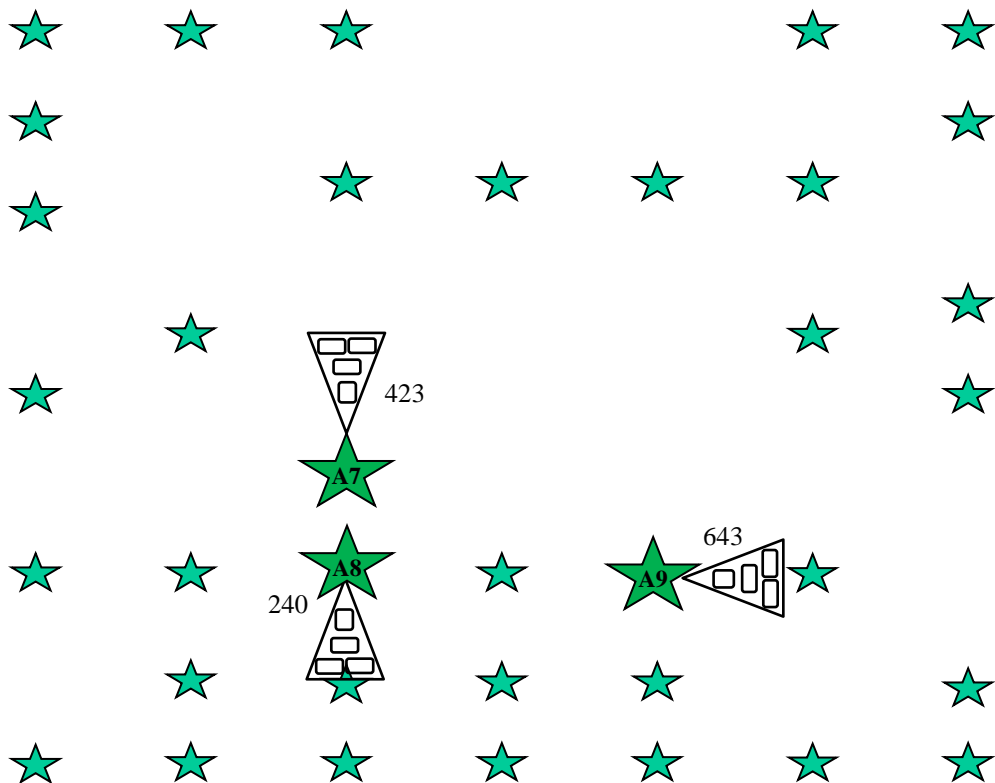
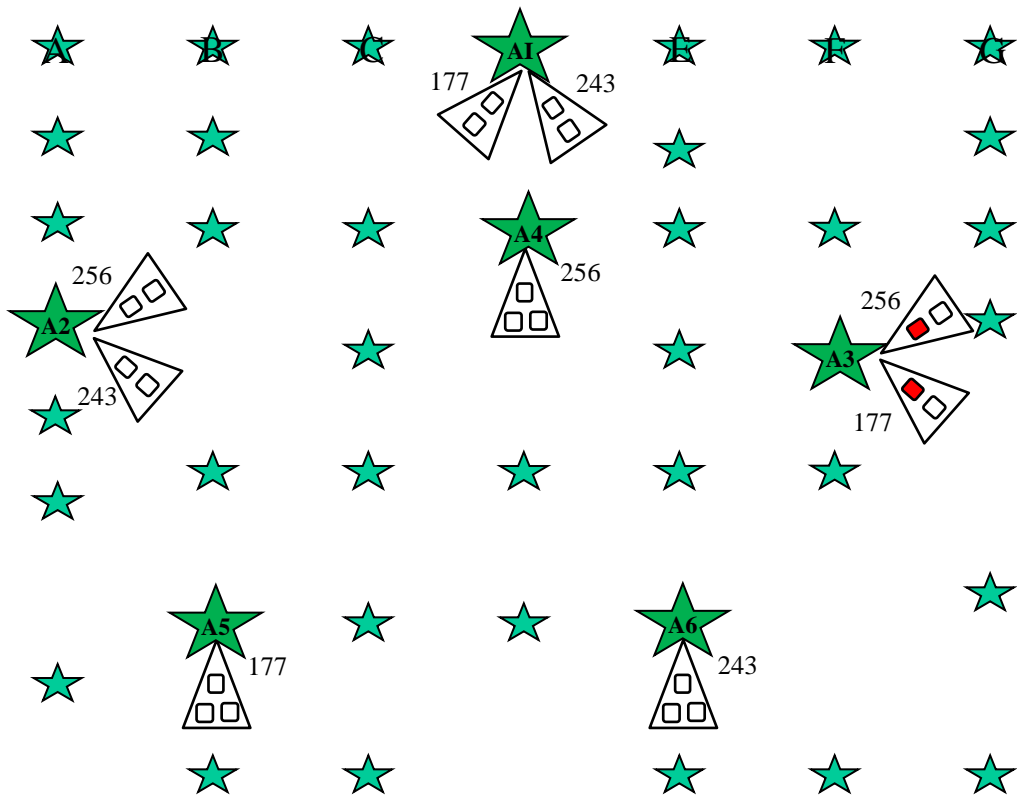
e.

>frk5

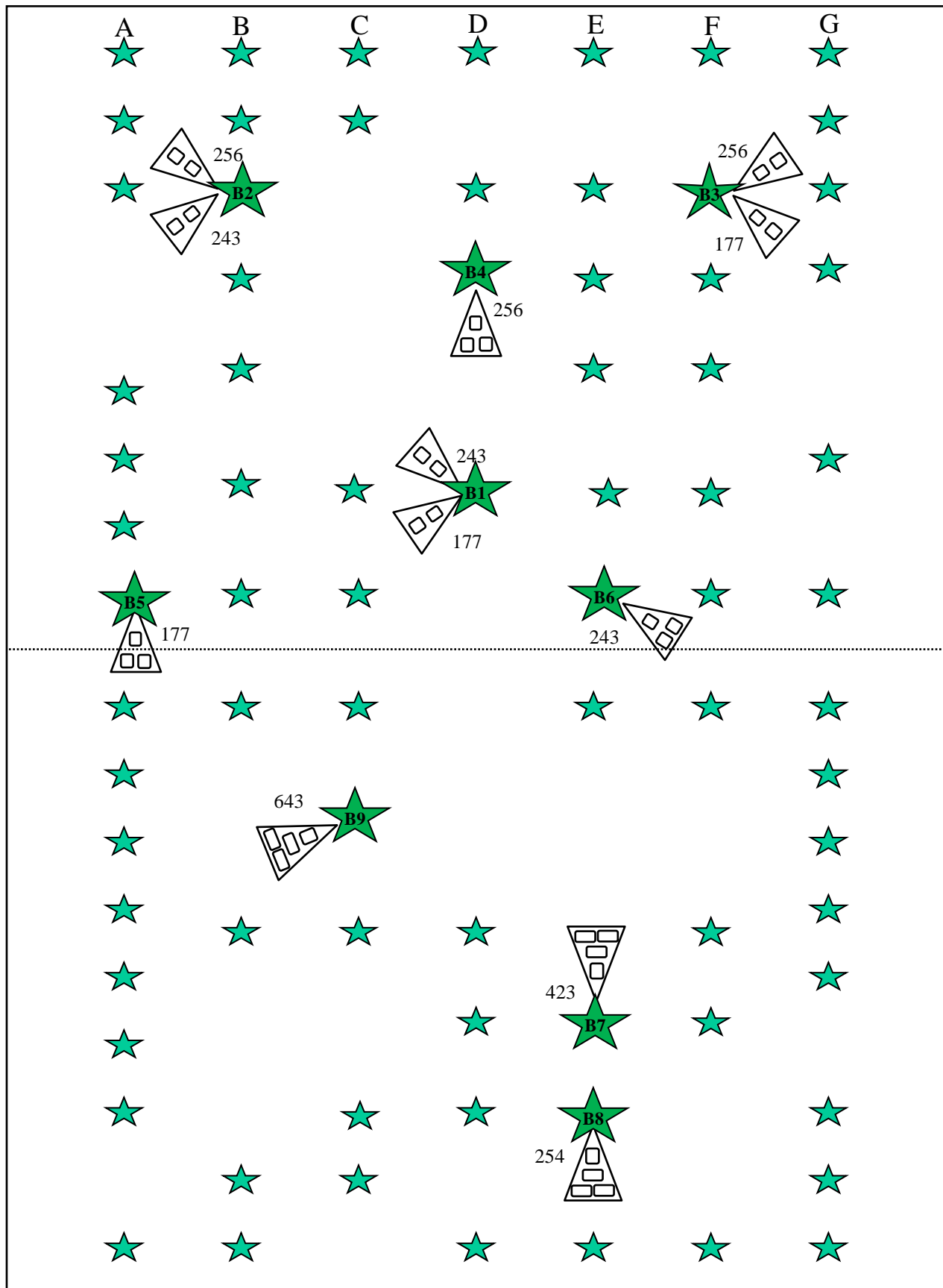
```
ATGGGAAACGTGGAATGTCTGGTTTCGACCAAAGTTTCGACGACGGACTGCCGTGATAGGTTCACTGACGTCACTATTATTAGCAC
GATCCGGAGCTCCGCGGTGAGAAATTCCAAACCTTTCCCAATTCCAATGCTACCTCGTATCATACTCGAAAATCTGCAAAGGA
TCATCCGATGCTCAGTTCACCGGAAATCTTCCCAAGGTTTCACTGGTCAAACGTATTTCTGTGAAATCAGGATCG
CCGTCCGAGTCTGAGCAGTATCTTGGCGAAGCGCGATCACTCGAAGCCATAGGTACCGCAGCTCCTGGGCTTGCGCCAGCGAT
GATTGCCTACGGTAACGGTGAAGATGGGAGCCTTTCTTTGTTTCGGAATACAAGGATATGGCGCCTCTGTCTTCGGGTGCCT
CTGATCTTCTAGCGAAGAGGCTGGCAACTGAGTTACATCAGTACAAGAGCCACGAGGGCTTTGGGTTTGAGGTTCCGACTTTT
TGTGGAGCAACGCGTCAGAGGAATGGCTGGTATACAACCTTGGGAGCAATGCTACAGTAATTTGATAGGGAATCTGCTAGATGG
TCTGTCTCGACGAGAGCATAGCGCTCTCTGACGAAGGGAGAAAAGATACGAGAAAGTACGTGCCTTTGACCGAGCGAATTG
AGATGGCAGCTAATTAGTTAAAATGAACGCAAATCAGGGTGATTCCAGATTGCTTGGTACGAGAGTACAGTCTCGATTATG
TCCTTTCTTGA
```

Figure S2- Séquences des cinq allèles du marqueur correspondant à la région 5' du gène *frk*, portés par les six noyaux des trois souches d'*A. bisporus* var. *bisporus* Bs177 (*frk1/frk1*), Bs243 (*frk2/frk3*) et Bs256 (*frk4/frk5*). Les SNP polymorphes permettant la discrimination des différentes formes alléliques sont encadrées en couleur.

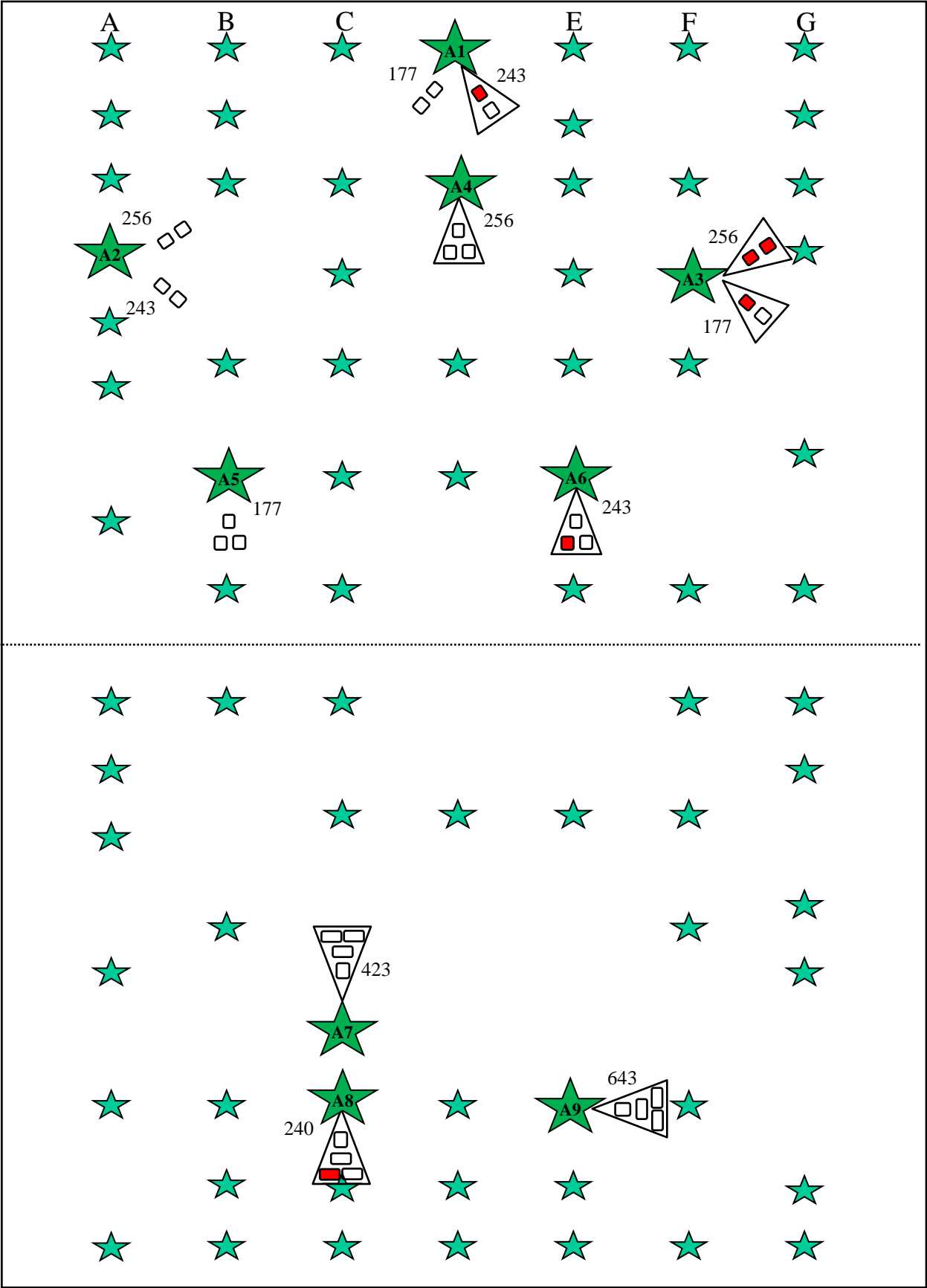
Parcelle I, 08/01/2013 (1^{ère} Volée)



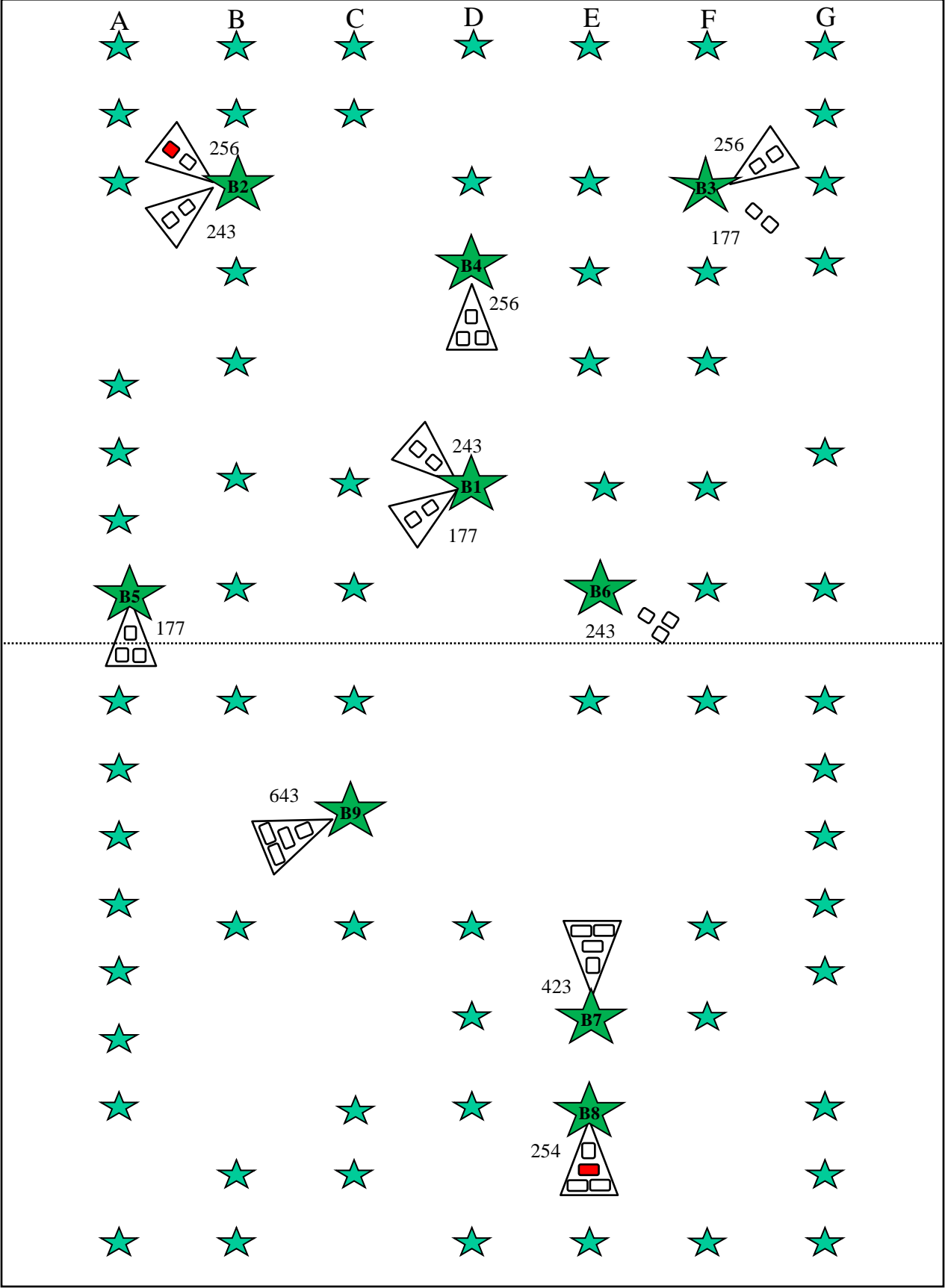
Parcelle II, 08/01/2013

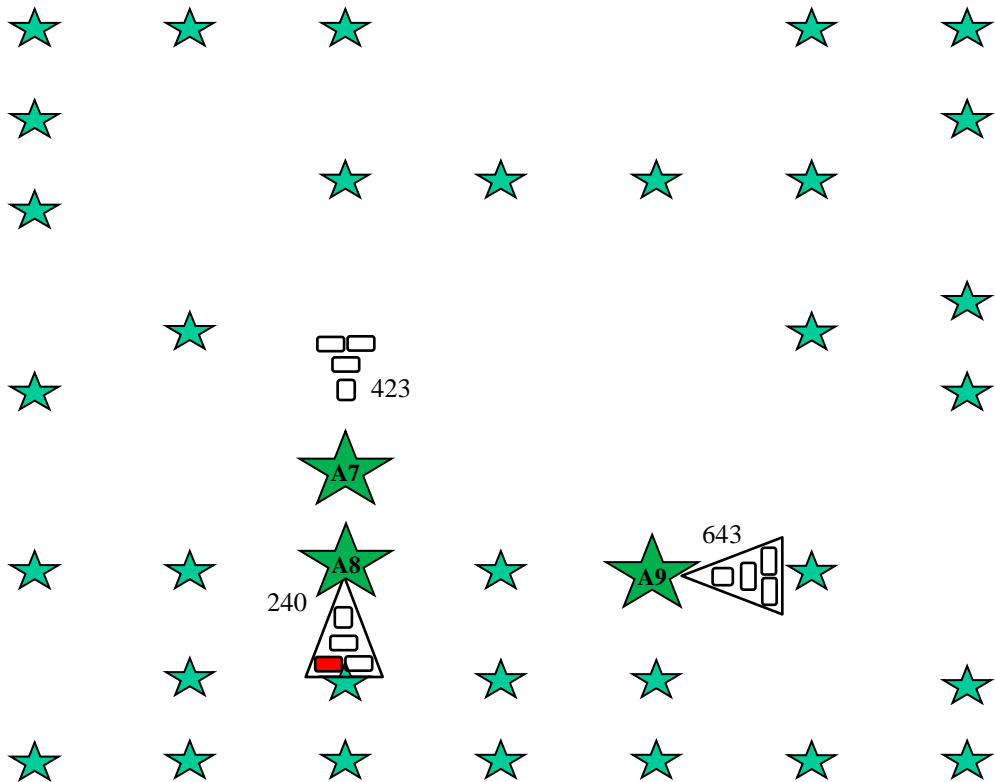
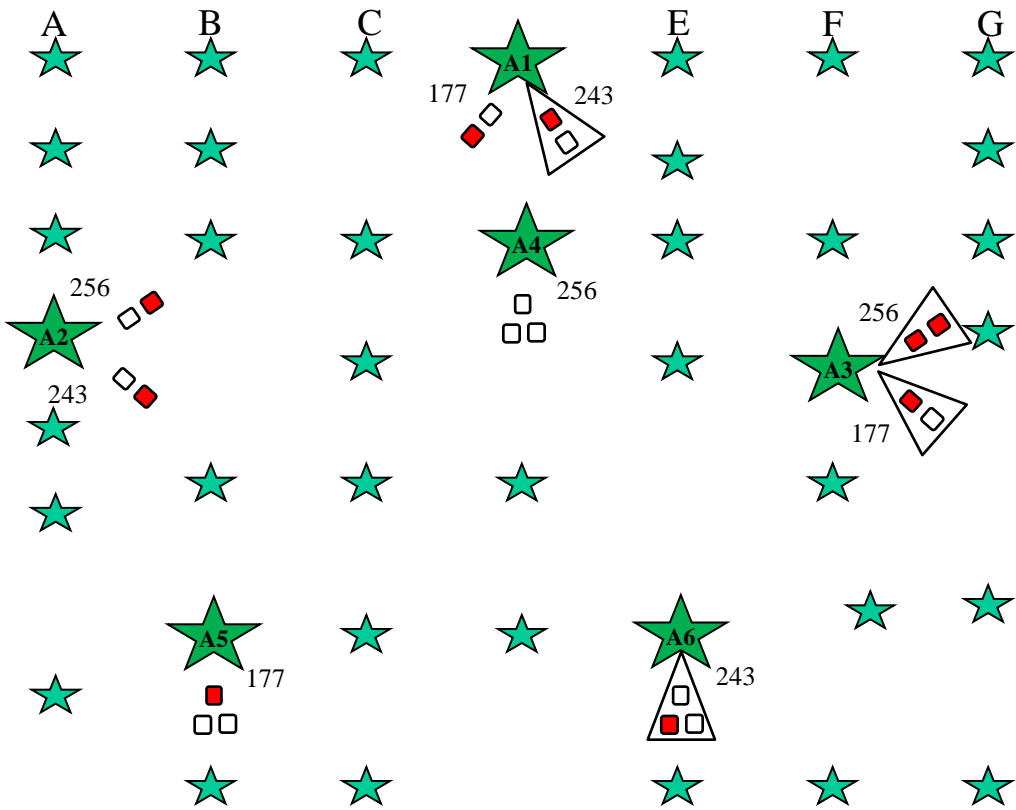


Parcelle I, 11/01/2013 (1^{ère} Volée)

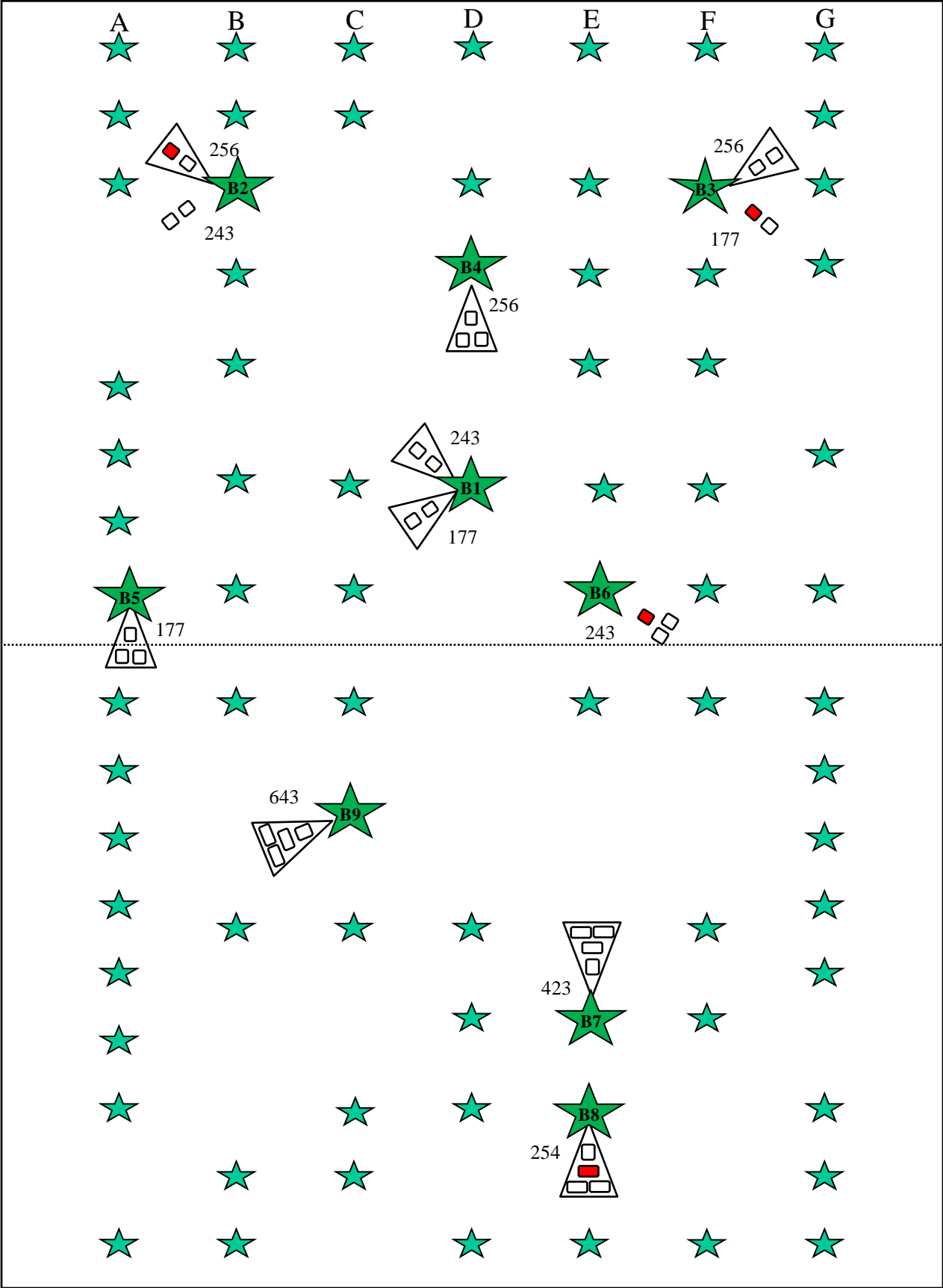


Parcelle II, 11/01/2013 (1^{ère} Volée)

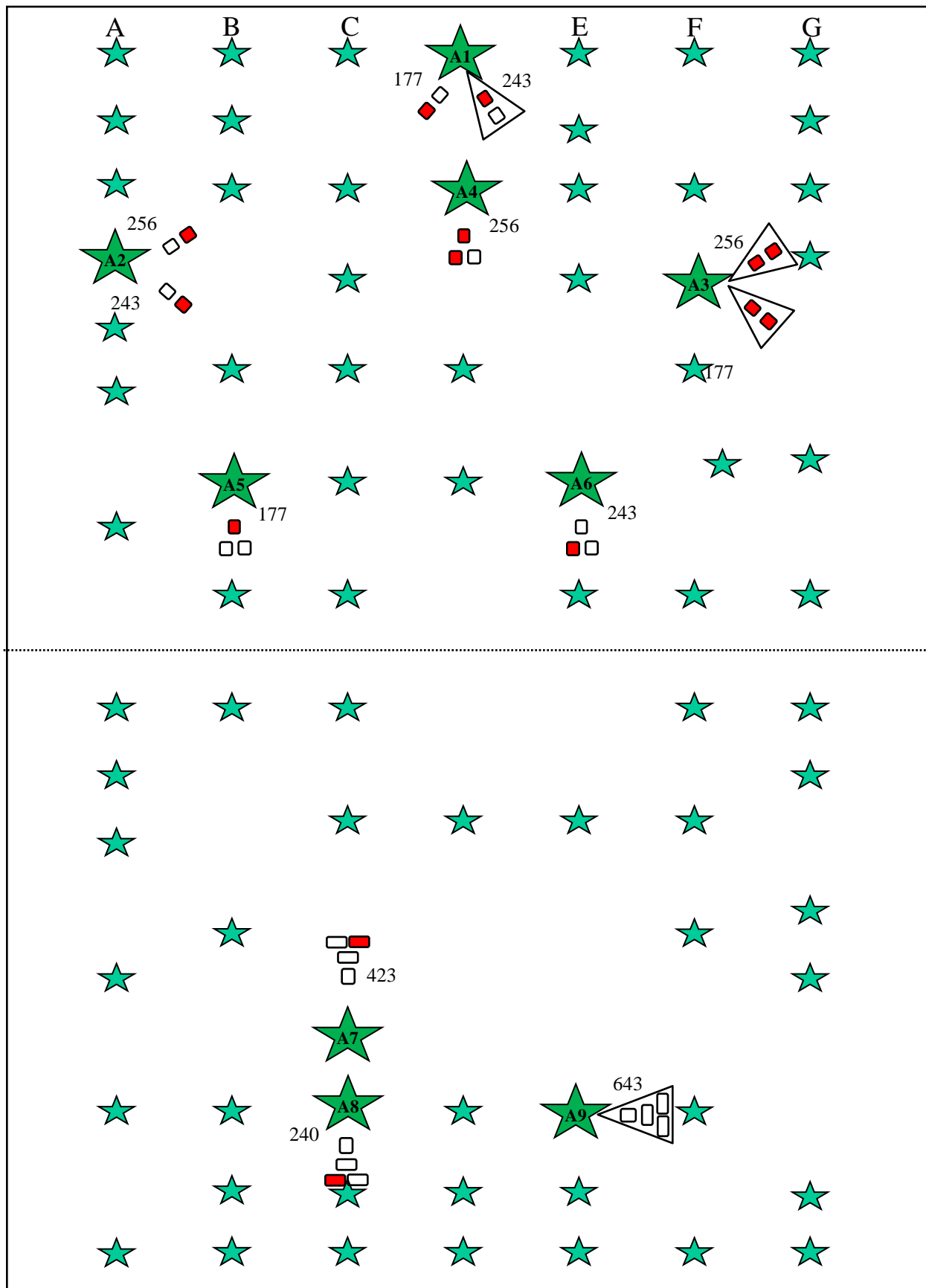


Parcelle I, 18/01/2013 (1^{ère} Volée)

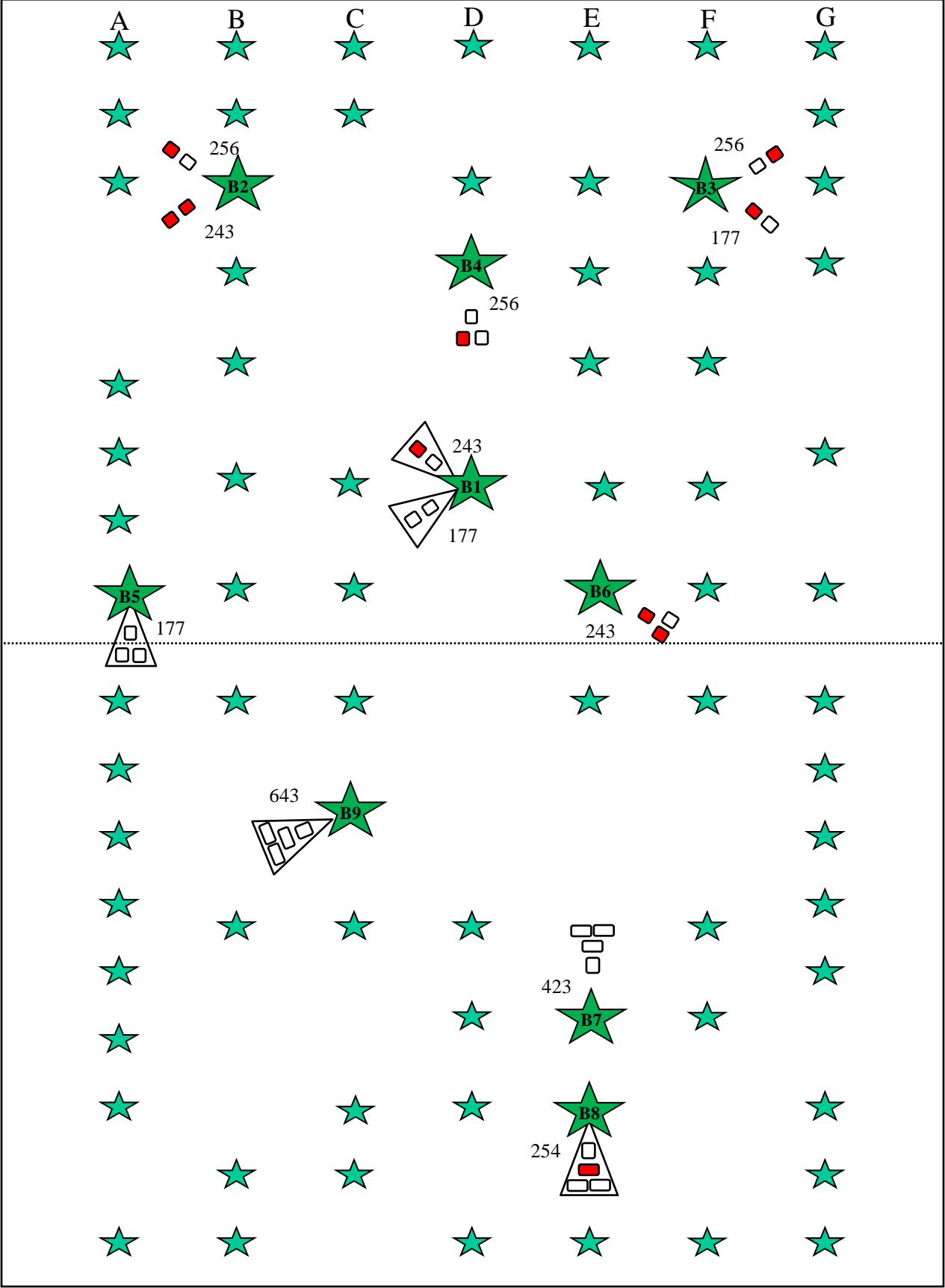
Parcelle II, 18/01/2013 (1^{ère} Volée)



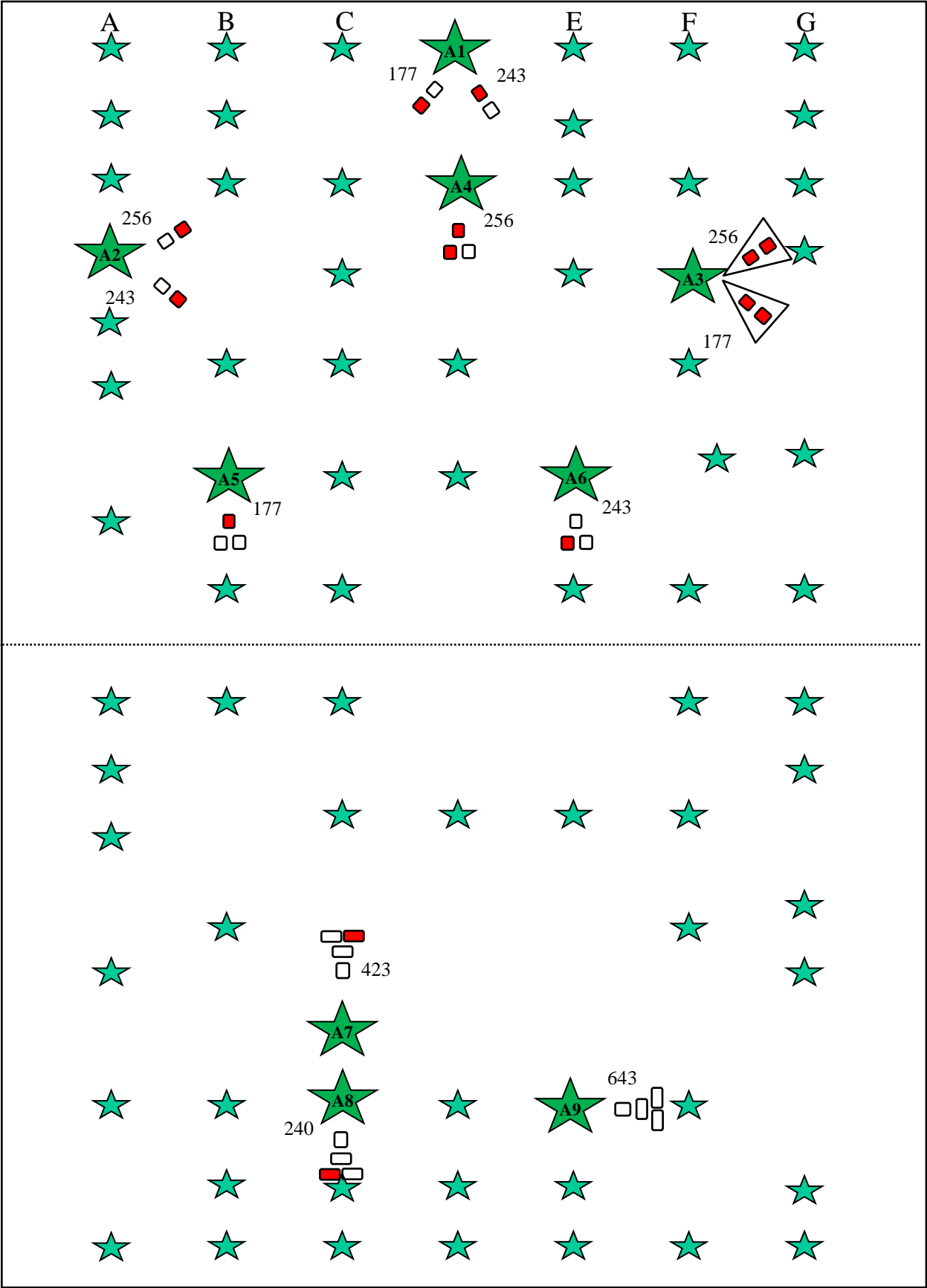
Parcelle I, 01/02/2013 (1^{ère} Volée)



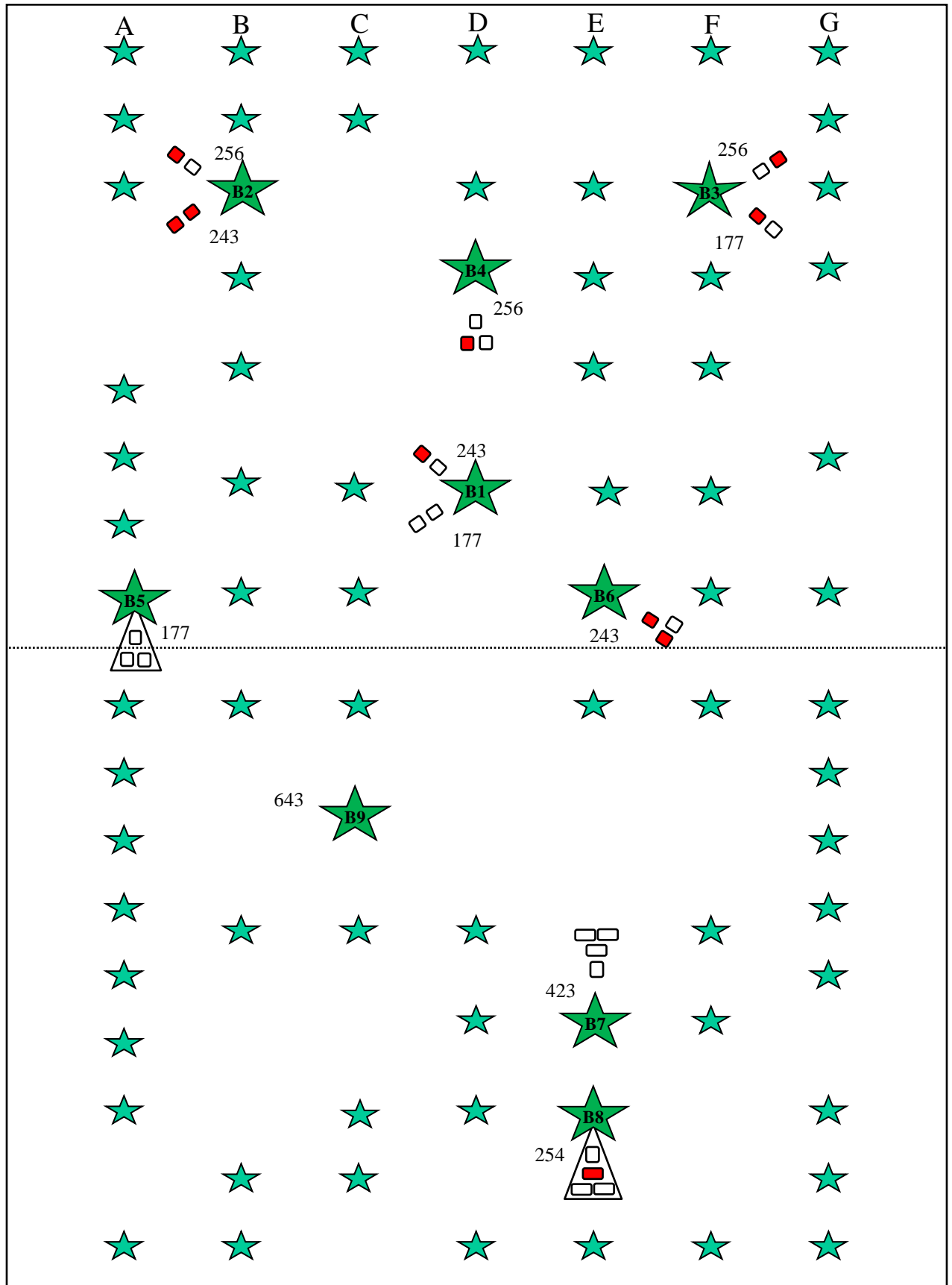
Parcelle II , 01/02/2013 (1^{ère} Volée)



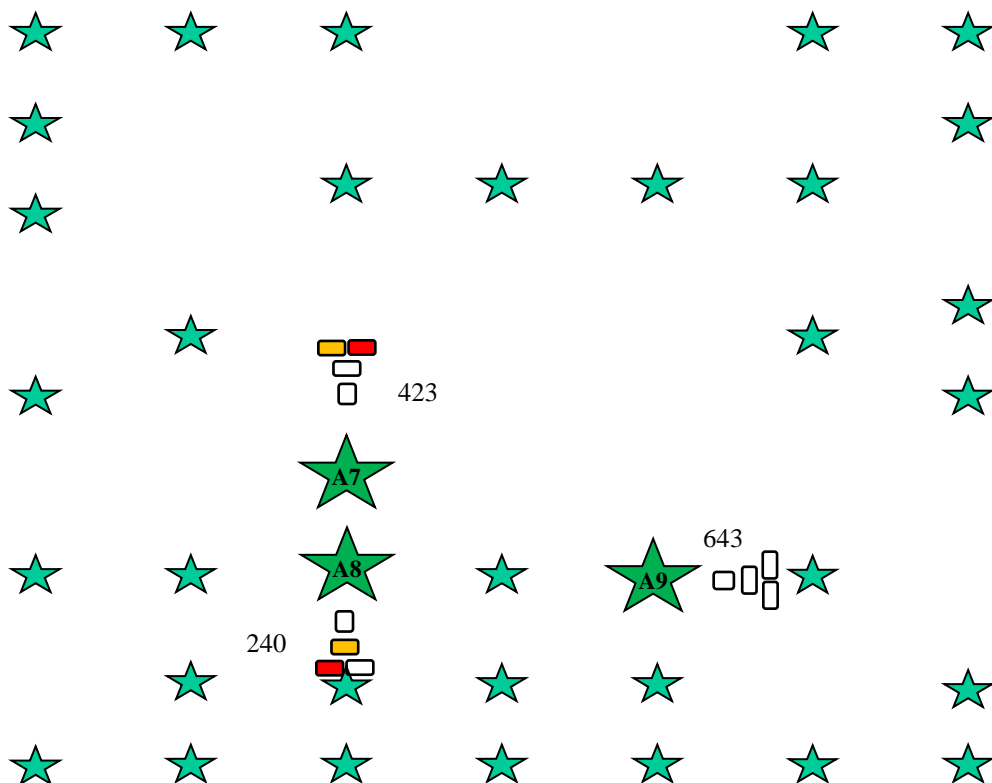
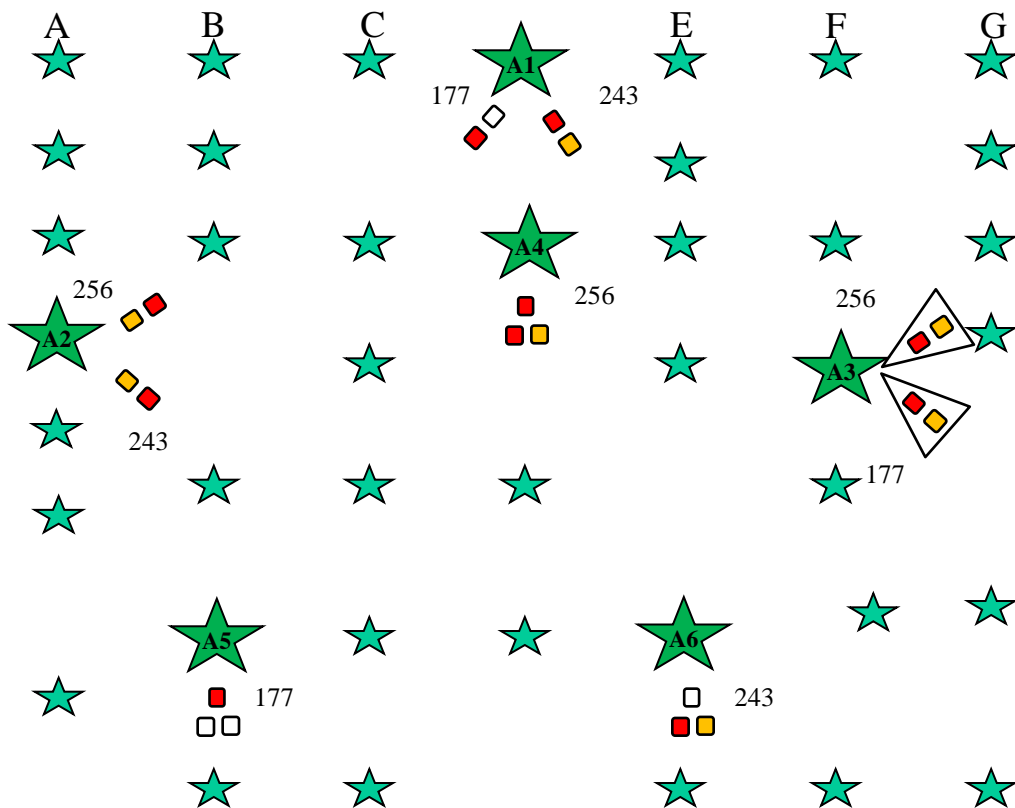
Parcelle I, 23/03/2013 (1^{ère} Volée)



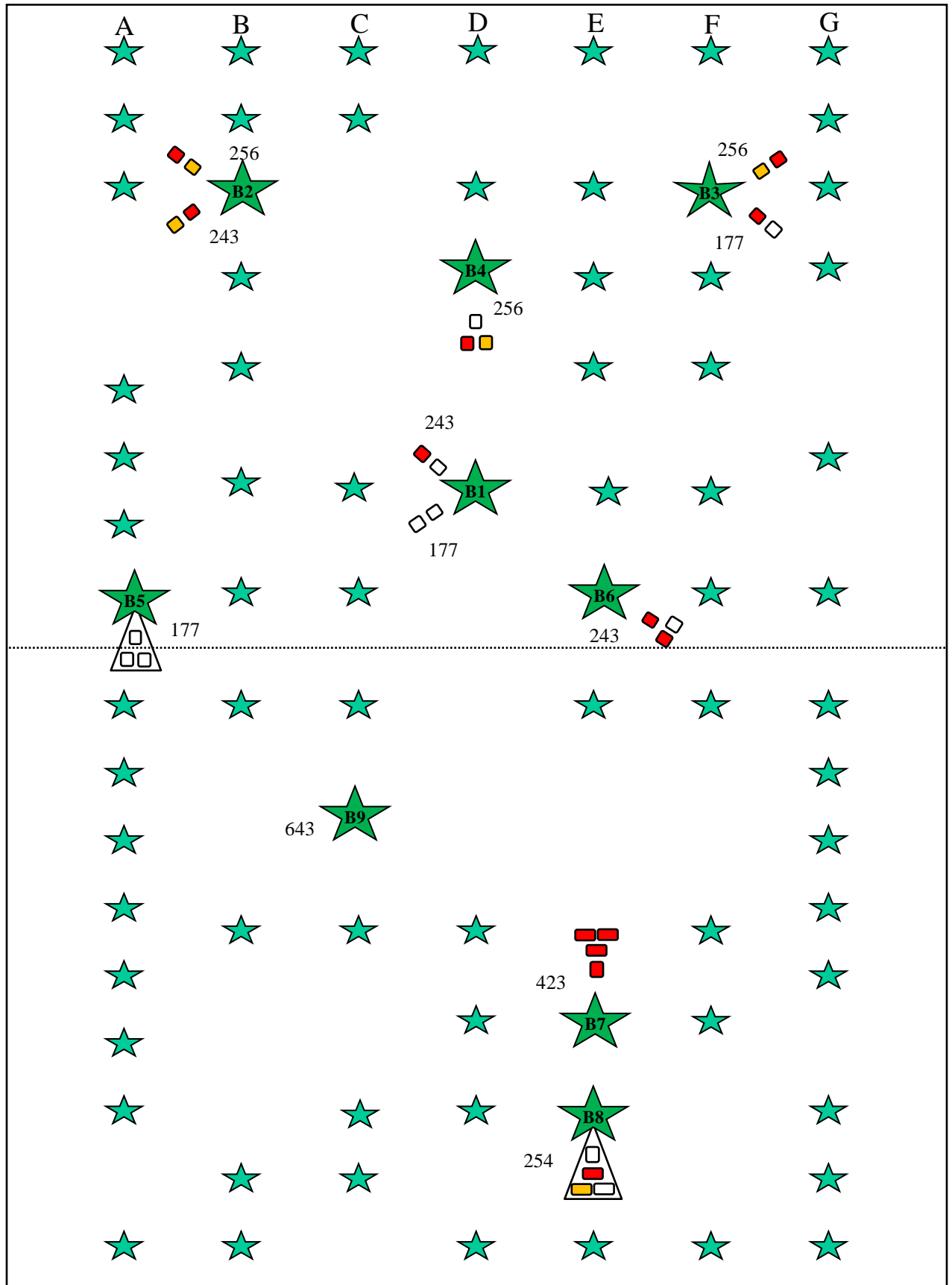
Parcelle II, 23/03/2013 (1^{ère} Volée)



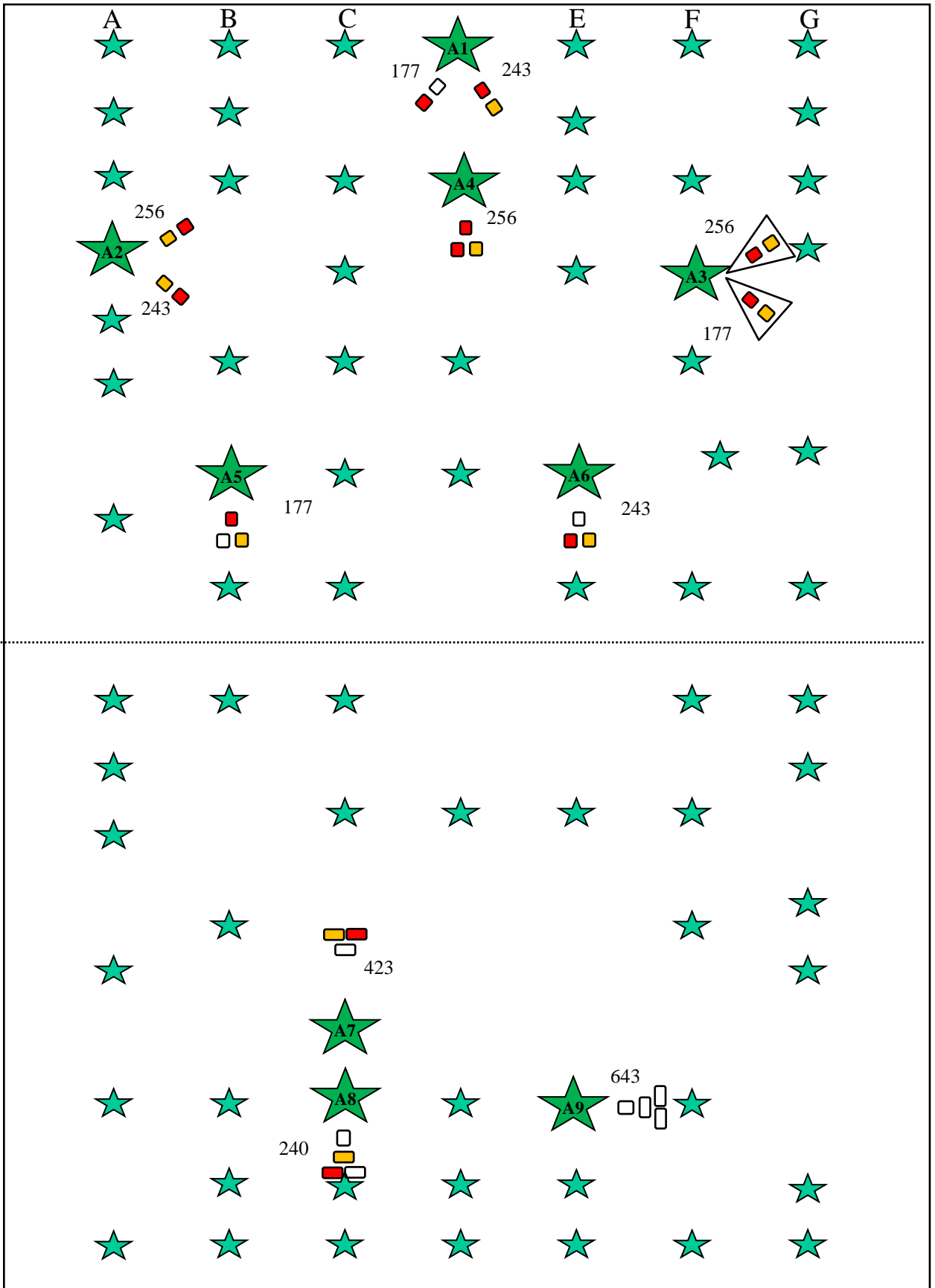
Parcelle I, 29/03/2013 (1^{ère} et 2^{ème} volée)



Parcelle II, 29/03/2013 (1^{ère} et 2^{ème} volée)



Parcelle I, 16/04/2013 (1^{ère} et 2^{ème} volée)



Parcelle II, 16/04/2013 (1^{ère} 2^{ème} volée)

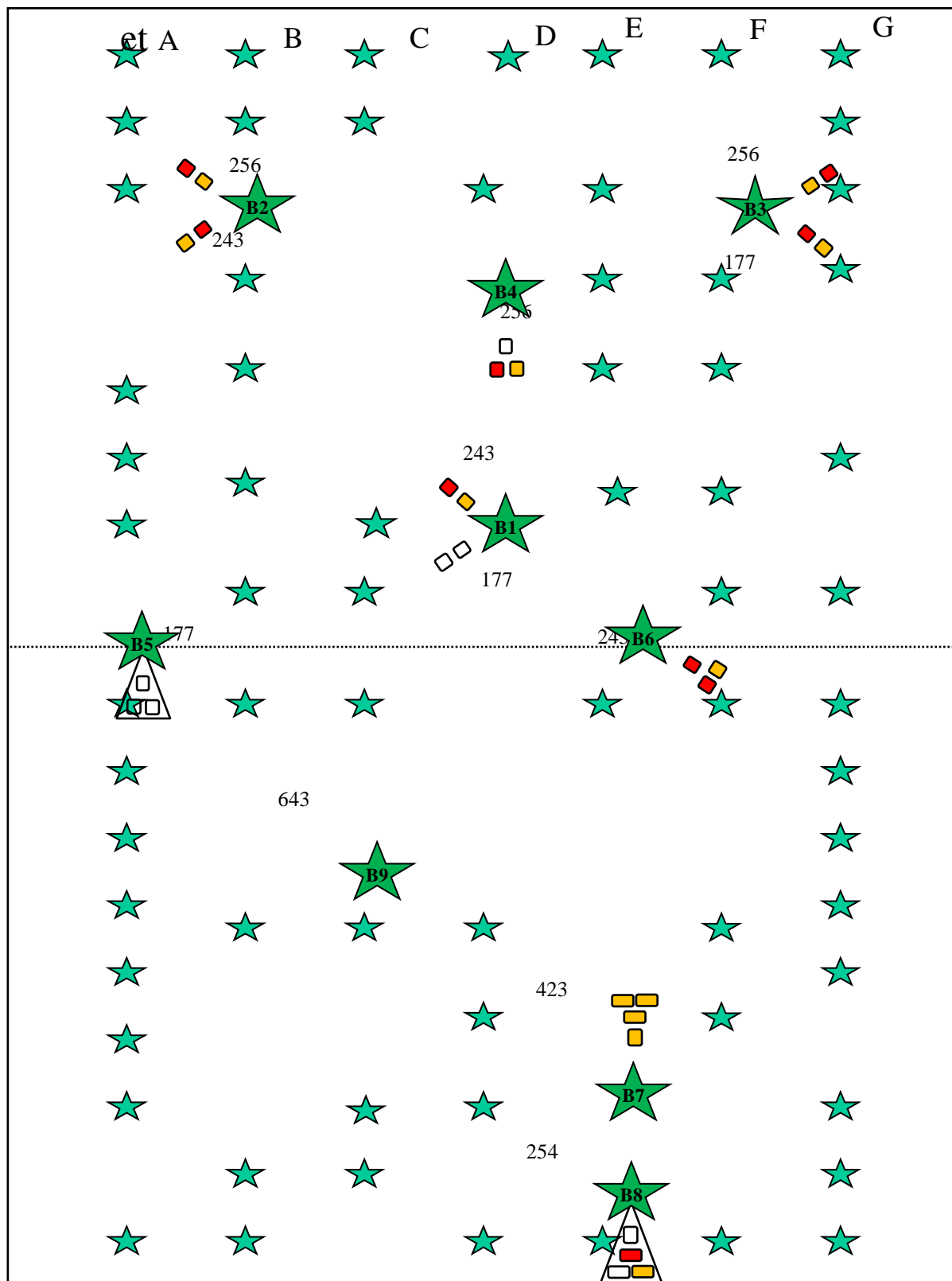


Figure S3- La chronologie d'apparition des sporocarpes sur les parcelles I et II, entre le 08/01/2013, date d'apparition des premiers sporocarpes, et le 16/04/2013, date d'apparition des derniers sporocarpes, sur les deux parcelles